

**Funktionelle Untersuchungen zur Rolle von Polyphosphat-bindenden Proteinen bei
der Immunantwort**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Marcel Strüve
geboren am 15.03.1990 in Bielefeld

Mainz, 2019

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.2020

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt und alle Hilfsmittel – wie etwa Literatur, Apparaturen oder Materialien – angegeben habe. Die Arbeit wurde nicht, auch nicht Teile hiervon, bei einer anderen Fakultät oder in einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

November 2019, Marcel Strüve

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Seite
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	4
2.1. Sepsis	4
2.1.1. Sepsis – Definition und Ätiologie	4
2.1.2 Sepsis – Molekulare Pathologie und Cytokinantwort	5
2.1.3 Sepsis - gegenwärtige Behandlungsansätze	11
2.2. Anorganische Polyphosphate	13
2.2.1. Anorganische Polyphosphate in Prokaryoten, Protisten und höheren Eukaryoten	13
2.2.2. Anorganische Polyphosphate in Entzündung und als mikrobielle Pathogenitätsfaktoren	16
2.2.3. Kandidatengene für Polyphosphatrezeptoren in Makrophagen	17
2.2.3.1 TMEM206	18
2.2.3.2 MYADM	20
2.2.3.3. TMCO1	22
2.3. Arbeitshypothesen	24
3. Material und Methoden	25
3.1. Material	25
3.1.1. Laborbedarf	25
3.1.2. Puffer und Medien	26
3.1.3. Reagenzien und Chemikalien	27
3.1.4. Molekularbiologische Kits	29
3.1.5. Agonisten und Inhibitoren	30
3.1.6. Zelllinien und Bakterienstämme	30
3.1.7. Antikörper	30
3.1.7.1 FACS-Antikörper	30
3.1.7.2. Western Blot Antikörper	32
3.1.8. qPCR-Primer	32
3.1.9. Geräte	33
3.1.10 Mausstämme	34
3.2. Methoden	34
3.2.1. Tiermodelle	34
3.2.1.1. Herstellung knochenmarkschimärer Mäuse	34
3.2.1.2. Endotoxämie	34
3.2.1.3. Gewinnung von Knochenmarksmakrophagen	35
3.2.1.4. Bestimmung klinisch-chemischer Parameter und Blutbilder	35
3.2.2. Molekularbiologische Methoden	36
3.2.2.1 CRISPR Mutagenese	36
3.2.2.1.1. Funktionsprinzip	36
3.2.2.1.2. Methodischer Ablauf	38
3.2.2.2. Genotypisierung von Mäusen	39
3.2.2.2.1. Lyse von Ohrbiopsien	39
3.2.2.2.2. Genotypisierungs-PCR	39
3.2.2.3 Phusion®-PCR	40
3.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese	41
3.2.2.5. Extraktion und Reinigung von PCR-Fragmenten aus Agarose-Gelen	41
3.2.2.6. Sequenzierung	41

Kapitel	Seite
3.2.2.7. RNA-Isolation	42
3.2.2.8. cDNA-Synthese	42
3.2.2.9. Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR)	43
3.2.3. Mikrobiologie	43
3.2.3.1. Bestimmung der bakteriellen Zelldichte von <i>E. coli</i> in Suspension	43
3.2.3.2. Rekombinante Expression von ScPPX	43
3.2.3.3. Zellaufschluss von <i>E. coli</i>	44
3.2.4. Proteinbiochemische Methoden	44
3.2.4.1. Partikel-basierte Zytokinquantifizierung	44
3.2.4.2. Affinitätschromatographie von His ₆ -PPX an Ni-NTA	44
3.2.4.3. Entsalzung / Pufferwechsel von Proteinproben	45
3.2.4.4. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Methode	45
3.2.4.5. Aktivitätsbestimmung rekombinanter ScPPX	46
3.2.4.6. Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	46
3.2.4.7. Bestimmung des Endotoxingehalts von Proteineluaten	47
3.2.4.8. Entfernung von Endotoxin aus Proteineluaten	47
3.2.4.9. Western Blot	47
3.2.5. Durchflusszytometrie	48
3.2.5.1. Herstellung einer Einzelzellsuspension der Milz	48
3.2.5.2. Färbung gegen Oberflächenantigene	48
3.2.5.3. Intrazelluläre Färbung für die Durchflusszytometrie	49
3.2.5.4. Phosflow Färbung zur Evaluierung des Phosphorylierungsstatus von Signalmolekülen	49
3.2.5.5. PrimeFlow RNA-Färbung	49
3.2.5.6. FACS-Messung	50
3.2.6. Zellkulturtechniken	51
3.2.6.1. Kryokonservierung von Zellkulturlinien und Knochenmarkszellen	51
3.2.6.2. Herstellung von L-Zell-Überstand	51
3.2.6.3. Bestimmung der Gesamtzellzahl für <i>in vitro</i> Experimente	51
3.2.7. Funktionelle Tests	52
3.2.7.1. Griess Test	52
3.2.7.2. BIOMOL Green Assay	52
3.2.7.3. ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	52
3.2.7.4. pHrodo™ Phagocytosetest	53
3.2.7.5. Zelluläres Überleben unter aziden Bedingungen	53
3.2.8. Statische Auswertung	53
3.2.9. Bioinformatik: Genetzte Software und Datenbanken	53
4. Ergebnisse	54
4.1. L-PolyP	54
4.1.1 L-PolyP moduliert die Cytokinantwort <i>in vitro</i>	54
4.1.2. L-PolyP moduliert die Antigenpräsentation und das inflammatorische Potenzial	54
4.1.3. Inaktivierung von L-PolyP <i>in vivo</i> verbessert das Überleben im Rahmen polymikrobieller Sepsis	57
4.2. MYADM	61
4.2.1. MYADM bindet L-PolyP und ist ein LPS-reguliertes Gen	61

Kapitel	Seite
4.2.2. MYADM ^{-/-} Mäuse sind lebensfähig, fertil und zeigen keinen aberranten Phänotyp	62
4.2.3. Untersuchungen zur Cytokinsekretion in MYADM-Knock-out Mäusen	68
4.2.4. IL1R2 und TGFβR2 sind in MYADM ^{-/-} Mäusen reduziert exprimiert	69
4.3. TMEM206-Knock-out	70
4.3.1. TMEM206 bindet L-PolyP und ist ein LPS-reguliertes Gen	70
4.3.2. TMEM206 ^{-/-} Mäuse sind lebensfähig, fertil und zeigen keinen krankhaften Phänotyp	72
4.3.3. TMEM206 ist in professionellen Antigen-präsentierenden Zellen stark exprimiert	76
4.3.4. TMEM206 ^{-/-} BMDM sind gegenüber Säure-induziertem Zelltod geschützt	80
4.3.5. TMEM206 ^{-/-} BMDM zeigen eine reduzierte antimikrobielle Aktivität	82
4.3.6. Studien zum Einfluss von TMEM206 auf STAT-Signalgebung und die Expression von MHC-II und costimulatorischen Molekülen	85
4.4. TMCO1	89
4.4.1. TMCO1 bindet L-PolyP und seine Genexpression wird durch LPS moduliert	89
4.4.2. TMCO1 ^{-/-} Mäuse sind subfertil und subviabel	89
4.4.3. TMCO1 moduliert die inflammatorische Cytokinantwort <i>in vivo</i>	90
5. Diskussion	94
5.1. L-PolyP	94
5.1.1. Die Rolle von L-PolyP bei der Modulation der Wirts-Immunantwort	94
5.1.2. Therapeutisches Potenzial der enzymatischen Degadation von L-PolyP	96
5.2. MYADM	98
5.2.1. Generierung und Phänotypisierung von MYADM ^{-/-} Mäusen	98
5.2.2. Rolle von MYADM bei der zellulären Signalgebung im Entzündungsgeschehen	102
5.3. TMEM206	103
5.3.1. Generierung und Phänotypisierung von TMEM206 ^{-/-} Mäusen	103
5.3.2. Bedeutung von TMEM206 für die Makrophagenfunktion	106
5.4. TMCO1	108
6. Ausblick	109
6.1. Rolle von L-PolyP im Rahmen systemischer, bakterieller Infektion	109
6.2. Rolle Polyphosphat-bindender Proteine in der Immunantwort	110
Danksagung	113
Literaturverzeichnis	114

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Bezeichnung	Seite
Abb. 1	Zelluläre Signalgebung während Entzündung und Sepsis	7
Abb. 2	Biochemische Eigenschaften und Funktionen von Polyphosphat	14
Abb. 3	Vorhergesagte Membrantopologie für murines TMEM206 und Modelldarstellung	19
Abb. 4	Vorhergesagte Transmembransegmente sowie theoretisches Modell der Myadm-Topologie	21
Abb. 5	Funktionsprinzip von CRISPR/Cas9	37
Abb. 6	Geplantes Ablaufschema der Affinitätschromatographie von ScPPX	45
Abb. 7	Effekte von L-PolyP auf die durch verschiedene TLR-Agonisten induzierte Immunantwort	54
Abb. 8	L-PolyP moduliert Antigenpräsentation und Irg1-Induktion im BMDMs	55
Abb. 9	Effekt von Dimethylitaconat auf differenzierte BMDM <i>in vitro</i>	56
Abb. 10	Reinigung rekombinanter Exopolyphosphatase und Aktivitätstestung	58
Abb. 11	<i>In vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Effekt von PPX-Behandlung	59
Abb. 12	Anreicherung von MYADM über L-PolyP-gekoppelte Säule sowie Expression von MYADM in BMDM und bekannte Interaktionspartner	61
Abb. 13	CRISPR-Strategie, Genotypisierung, Sequenzierung und Zuchtstatistik für MYADM-Knock-out Tiere	63
Abb. 14	Phänotypisierung von MYADM-KO-Tieren	65
Abb. 15	<i>Gating</i> -Strategie für die Analyse myeloider Zellpopulationen der Milz von MYADM-Tieren	67
Abb. 16	<i>Gating</i> -Strategie für NK-Zellen sowie B- und T-Lymphozyten der Milz	68
Abb. 17	Einfluss eines MYADM-Verlusts auf die Antwort gegenüber TLR-2 und TLR-4 Agonisten sowie Interferonen	69
Abb. 18	IL1R2 und TGFBR2-Expression in MYADM ^{-/-} BMDM	70
Abb. 19	Anreicherung von TMEM206 durch Bindung an L-PolyP, Expression in BMDM und bekannte molekulare Interaktoren	71
Abb. 20	CRISPR-Strategie, PCR-Genotypisierung, Sequenzierung und Zuchtstatistik für TMEM206-Knock-out-Tiere	73
Abb. 21	Körper- und Organgewichte, Blutzellpopulationen und klinisch-chemische Parameter für TMEM206-Knock-out Tiere	75
Abb. 22	Expression von TMEM206 in BMDM	77
Abb. 23	Expression von TMEM206 in Immunzellpopulationen der Milz	78
Abb. 24	<i>Gating</i> -Strategie für die Analyse von Immunzellpopulationen der Milz hinsichtlich TMEM206-Expression	79
Abb. 25	Bestimmung der Säure-vermittelten Cytotoxizität in BMDM	80
Abb. 26	<i>Gating</i> -Strategie für die Analyse der Lebendzellpopulation von BMDM	81
Abb. 27	iNOS-Expression in TMEM206 ^{-/-} und Wildtyp-BMDM	83
Abb. 28	Indirekte Messung der Phagozytoseleistung von BMDM mit pHrodo <i>E. coli</i>	84
Abb. 29	Cytokinsekretion durch TMEM206-Knock-out BMDM im Vergleich zum Wildtyp	85
Abb. 30	Untersuchung der STAT3(Y705)-Phosphorylierung in Splenozyten	86
Abb. 31	Untersuchung von CD80- und CD86-Expression in BMDM	88

Abbildung	Bezeichnung	Seite
Abb. 32	Expression von TMCO1 in BMDM sowie Anreicherung von TMCO1 an L-PolyP	89
Abb. 33	Zuchtstatistik für die heterozygote TMCO1-Zucht	90
Abb. 34	Endotoxämiemodell mit TMCO1-Knock-out Tieren	91
Abb. 35	<i>Gating</i> -Strategie für Zellpopulationen der Peritoneallavage nach Endotoxämie	92
Abb. 36	Quantifizierung von Zelltypen der Peritoneallavage endotoxischer TMCO1 ^{-/-} und Kontrolltiere	93

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Bezeichnung	Seite
Tab. 1	Verwendete Laborbedarfsartikel	25
Tab. 2	Verwendete Puffer und Medien	26
Tab. 3	Verwendete Reagenzien und Chemikalien	27
Tab. 4	Verwendete Kits	29
Tab. 5	Verwendete Stimulantien und Arbeitskonzentrationen	30
Tab. 6	Verwendete Zelllinien	30
Tab. 7	Verwendete Bakterienstämme	30
Tab. 8	Verwendete FACS-Antikörper	31
Tab. 9	Für den Western Blot verwendete Primär- und Sekundärantikörper	32
Tab. 10	Primer für die quantitative <i>Real-time</i> PCR	32
Tab. 11	Verwendete Laborgeräte	33
Tab. 12	Verwendete Mausstämme und Bezugsquellen	34
Tab. 13	Arbeitsfluss und Reagenzschema für die Genomeditierung mittels klonierungsfreiem CRISPR/Cas9	39
Tab. 14	Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die Genotypisierung	39
Tab. 15	Primerkombinationen für die Genotypisierung von Knock-out-Mausstämmen	40
Tab. 16	Ablaufschema und Bedingungen der Genotypisierungs-PCRs	40
Tab. 17	Komponenten der Phusion [®] -PCR und Erstellung des PCR-Ansatzes	40
Tab. 18	Durchführung der Phusion [®] -PCR - <i>Thermocycling</i> -Bedingungen	41
Tab. 19	Sequenzierungsprimer für TMEM206 (Exon 2) und MYADM (Exon 3)	42
Tab. 20	Ablauf der cDNA-Synthese. Temperatur und Zeitverlauf im <i>Thermocycler</i>	42
Tab. 21	Ablauf der qPCR. Temperatur-, Zeit- und Zyklenverlauf während der quantitativen PCR.	43
Tab. 22	Referenzwerte für klinisch-physiologische Parameter adulter C57BL6/J Mäuse und Vergleich mit den experimentell erhaltenen Daten	101
Tab. 23	Gegenüberstellung erhaltener klinisch-chemischer Parameter für TMEM206-Knock-out Mäuse für Männchen und Weibchen und Angabe der Referenzwerte	105

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
2-NBDG	2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Desoxyglukose
Abb.	Abbildung
ACTB	β -Actin
ACOD	<i>cis</i> -Aconitat-Decarboxylase
ADP	Adenosindiphosphat
AF488	Alexa Fluor® 488
Akt (PKB)	Proteinkinase B
ANOVA	Varianzanalyse (<i>Analysis of Variance</i>)
APC	<i>Antigen presenting Cell</i>
ARF	<i>ADP ribosylation Factor</i>
APC	Allophycocyanin
ASOR	<i>Acid-sensitive outwardly rectifying</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B6J	C57BL6/J Mausstamm
B6N	C57BL6/N Mausstamm
BCR	<i>biochemical recurrence</i>
BMDM	<i>bone marrow-derived macrophages</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BV510	<i>Brilliant Violet 510</i>
C5	Komplementkomponente C5
C5a	Aktivierte Komplementkomponente C5
Ca ²⁺	Calciumionen
CaM	Calmodulin
CAMK	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>
Cas9	CRISPR-associated protein 9
CCL-2	<i>CC motif chemokine Ligand 2</i>
CDS	Cerebrofaciothorakales Dysplasie (CTFD) Spektrum
Cl ⁻	Chloridionen
CIC	<i>Chloride Channel</i>
CLP	Caecum Ligatur und Punktion
CXCL10	<i>CXC motif chemokine ligand 10</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDS	Cerebrofaciothorakales Dysplasie Spektrum
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFTD	Cerebrofaciothorakale Dysplasie
CLAC	<i>Ca²⁺ load activated channel</i>
CLR	C-typ Lektin Rezeptor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRAC	<i>Ca²⁺-release activated channel</i>
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	CRISPR RNA
CSS	Klinischer Schweregrad (<i>Clinical Severity Score</i>)
Cy5.5	Cyanin 5.5
DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern</i>

DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	Vollentmineralisiertes Wasser
DF	Durchfluss
DI	Dimethylitaconat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DRM	<i>detergent resistant membranes</i>
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Eschericia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERM	Ezrin Radixin Moesin
EU	Endotoxin-Einheiten (<i>endotoxin units</i>)
EVB	Erythrocytenverteilungsbreite
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	Konstantes Fragment eines Antikörpers (Fc-Region)
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
Foxp3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
FSC	Vorwärtsstreuung (<i>forward scatter</i>)
FVD	<i>Fixable Viability Dye</i>
g	Erdbeschleunigung
G	Gauche
GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphatd-Dehydrogenase</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
gMFI	<i>Geometric Mean Fluorescence Intensity</i>
gp130	Glykoprotein 130
gRNA	<i>guideRNA</i>
GTP	Guanosintriphosphat
hTMEM206	Humanes TMEM206
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HMGB	<i>High Mobility Group Box 1</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horse radish peroxidase</i>)
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül (<i>Intracellular adhesion molecule</i>)
IFN	Interferon
IFNGR	Interferon-γ Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IKK	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase</i>
IL-(10)	Interleukin-(10)
IP-10	Interferon-gamma induziertes Protein (<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>), auch: CXCL10

IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
Irg1	<i>Immuneresponsive gene 1</i>
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K ⁺	Kaliumionen
Kap.	Kapitel
KBU	Kolonienbildende Einheiten
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
KO	<i>Knock-out</i>
LAL	<i>Limulus Amoebocyte Lysate</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
L-PolyP	Langkettiges Polyphosphat
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
M	mol/l
MAC	Membranangriffskomplex (<i>membrane attack complex</i>)
MAL	Myelin und Lymphozyten Protein (<i>myelin and lymphocyte protein</i>)
MARVEL	<i>MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link</i>
MCP-1	<i>Monocyten chemotaktisches Protein (monocyte chemotactic protein 1)</i> , auch: CCL2
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen (<i>mean corpuscular volume</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
min	Minute
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messengerRNA</i>
mTORC	<i>Mammalian Target of Rapamycin Complex</i>
MTV	Mittleres Thrombozytenvolumen
MYADM	<i>Myeloid-associated differentiation marker</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
Na ⁺	Natriumionen
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NEMO	<i>NF-kappa-B essential modulator</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor κ B</i>
ng	Nanogramm
NLR	<i>NOD-like</i> Rezeptor
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NOS	NO-Synthase
NPC	Kernporenkomplex (<i>nuclear pore complex</i>)
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>

n.s.	Nicht signifikant
NTA	Nitriltriessigsäure
ORF	Offenes Leseraster (<i>Open Reading Frame</i>)
p	Wahrscheinlichkeit (Signifikanzniveaus)
P _i	Monophosphat (anorganisch)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAM	<i>Protospacer-adjacent motif</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PB	<i>Pacific Blue</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEGylierung	Polyethylenglykol-Konjugation
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PF4	<i>Platelet factor 4</i>
pg	Pikogramm
PI3K	Phosphoinositol-3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pmol	Pikomol
PPK	Polyphosphatkinase
PPX	Exopolyphosphatase
POI	Prämature Ovarinsuffizienz
PolyP	Polyphosphat
PRR	<i>Pattern Recognition</i> Rezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RANTES	<i>Regulated Upon Activation, Normally T-Expressed, And Presumably Secreted</i> , auch: CCL5
Ras	<i>Rat sarcoma</i> , kleine GTPase
Rho	<i>Ras homologue</i>
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene-1</i>
RLR	RIGI-like Rezeptor
RNA	Ribonucleinsäure
RNAseq	RNA-Sequenzierung
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
s	Sekunde
Sc(PPX)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>
Sp	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SPF	Spezifisch Pathogen-frei
S-PolyP	<i>short</i> PolyP
SOFA	<i>Sequential organ failure assessment</i>
SSC	Seitwärtsstreuung (<i>sideward scatter</i>)
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

TAK	<i>Transforming growth factor beta-activated kinase 1</i>
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline-Tween20</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TGFβ	Transforming growth factor beta
TLR	Toll-like Rezeptor
TMCO1	<i>Transmembrane and coiled-coil domain 1</i>
TMEM206	<i>Transmembrane protein 206</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
tracrRNA	<i>Transactivating CRISPR RNA</i>
TRAF6	<i>TNF receptor associated factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UCSC	<i>University of California Santa Cruz</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volumen
VCAM	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>)
VE-Cadherin	Vaskulärendothel-Cadherin
v/v	Volumen/Volumen
WSX1	IL-27 Rezeptor, α-Untereinheit
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen

1. Zusammenfassung

Anorganische Polyphosphate (PolyP) sind poly-anionische Polymere, die aus über hochenergetische Phosphoanhydridbindungen verknüpften Monophosphateinheiten bestehen. Während Säugetier-Thrombozyten hohe Konzentrationen kurzkettiger PolyP, mit einer mittleren Kettenlänge von etwa 70 Monophosphateinheiten, enthalten, werden in Mikroorganismen langkettige PolyP von mehreren hundert Monophosphateinheiten Länge (L-PolyP) vorgefunden. Die bakterielle Akkumulation von L-PolyP erfolgt unter Bedingungen von Umweltstress und Nährstoffmangel und dient primär der Phosphat- und Energiespeicherung. Der Auf- und Abbau dieser Polymere wird dabei enzymatisch durch die Enzyme Polyphosphatkinase und Exopolyphosphatase katalysiert.

Vor dem Hintergrund, dass L-PolyP bereits als Pathogenitätsfaktor humanpathogener Mikroorganismen beschrieben wurde, wurden im Rahmen dieser Dissertation die immunmodulatorischen Einflüsse von L-PolyP während systemischer bakterieller Infektion und der hierdurch bedingten, einsetzenden Entzündungsreaktion sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass L-PolyP ein starker Induktor von PF4 ist, die LPS-induzierte Sekretion von IL-27 jedoch hemmt. Darüber hinaus reduziert Co-Stimulation mit L-PolyP die LPS-induzierte Heraufregulation der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), sowie der *TAP1* und *Irg1*-Transkription. *TAP1* ist an der Beladung von MHC-I Molekülen beteiligt, während *Irg1* die enzymatische Produktion eines antimikrobiellen Metaboliten in Makrophagen katalysiert. Die Effektivität eines enzymatischen Verdaus des aus Mikroorganismen freigesetzten L-PolyP durch PPX als Sepsistherapie wurde in diesem Zusammenhang untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass das Überleben bereits einmalig nach Sepsisinduktion behandelter Tiere über den Beobachtungszeitraum gegenüber nicht behandelten Tieren signifikant verbessert ist. Das Versterben der Tiere gegenüber nicht behandelten Tieren setzte zudem verspätet ein.

Zur Aufklärung, wie die vor allen in Makrophagen beobachteten zellulären Effekte durch L-PolyP vermittelt werden, wurden in Vorarbeiten unserer Gruppe bereits mehrere potenzielle Rezeptorkandidaten identifiziert. Dafür wurden Daten genutzt, die einerseits aus Bindungsstudien mit L-PolyP maskierten Mikropartikeln und Gesamtzelllysaten muriner BMDM (*bone marrow-derived macrophages*) resultierten. Die Einzelproteine der gebundenen Proteinfraktion wurden dabei massenspektrometrisch identifiziert. Andererseits wurden im Rahmen der Vorarbeiten zudem stark L-PolyP und LPS regulierte Gene durch Transkriptomanalyse identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei der aus diesen der Arbeitsgruppe zur Verfügung stehenden Analysen übereinstimmend erhaltenen Kandidatengen (*MYADM*, *TMEM206* und *TMCO1*) genauer bezüglich ihrer immunologischen Funktion und ihrer Rolle in der Polyphosphatsignalgebung untersucht. Hierzu wurden globale *MYADM* und *TMEM206* Knock-out Mäuse generiert. Tiere dieser neu generierten Stämme zeigten im unbehandelten Zustand keinen offensichtlichen Phänotyp, waren fertil und lebensfähig. BMDM dieser Tiere wurden bezüglich ihrer Responsivität gegenüber L-PolyP untersucht. Sowohl in *MYADM*^{-/-} als auch *TMEM206*^{-/-} Makrophagen wurde weiterhin eine Hemmung der IL-27 Sekretion sowie starke PF4-Induktion beobachtet. Die Konzentration der durch *TMEM206*^{-/-} BMDM als Antwort auf LPS beziehungsweise L-PolyP sekretierten Cytokine IL-27 und PF4 war jedoch gegenüber dem Wildtyp erhöht. Darüber hinaus konnte eine geringere Phagozytoseleistung und NO-Produktion für die Knock-out-Makrophagen festgestellt werden. Starke *TMEM206*-Expression konnte primär in professionellen, Antigen-präsentierenden Zellen (B-Zellen, Makrophagen, Dendritische Zellen) lokalisiert werden. Für *MYADM*^{-/-} Mäuse konnten signifikante Veränderungen in der Expression der aus Humandaten bekannten molekularen Interaktoren TGFβ-Rezeptor TGFBR2 und des IL-1 decoy-Rezeptors IL1R2 in Makrophagen gefunden werden, die auf eine immunmodulatorische Funktion von *MYADM* hindeuten.

TMCO1^{-/-} Tiere zeigten eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduzierte Viabilität und Fertilität. Im *in vivo*-Modell der Endotoxämie konnten signifikant erhöhte Konzentrationen der Cytokine MIP1 α , MIP1 β , RANTES und IL-10 als Antwort auf die durch LPS-induzierte Immunreaktion gefunden werden.

Abstract

Inorganic polyphosphates (PolyP) are poly-anionic polymers consisting of monophosphate units linked by high-energy phosphoanhydride bonds. The chain lengths of these polymers are highly variable reaching from about 70 monomer units in platelet PolyP to several hundred monophosphate units in bacteria. Bacterial accumulation of PolyP takes place under conditions of environmental stress or scarcity of nourishing factors and serves primarily phosphate- and energy storage. Enzymatic processes are used to build and elongate PolyP chains as well as for degradation. Transfer of phosphate monomers from ATP to the growing PolyP chain is facilitated by polyphosphate kinases (PPK) while degradation occurs by the activity of exopolyphosphatase (PPX).

Since long-chain PolyP (L-PolyP) were described as virulence factors of human pathogenic bacteria in the past, the immune modulatory effects of L-PolyP during systemic bacterial infection and inflammation were assessed by this work using both *in vitro* and *in vivo* methods. In *in vitro* experiments with bone-marrow derived macrophages (BMDM), L-PolyP was identified as a strong inducer of the PF4 (CXCL4) cytokine and an inhibitor of LPS-induced IL-27 and IP-10/CXCL10 secretion as well as LPS-induced iNOS expression in macrophages. Furthermore, LPS-induced TAP1, which is involved in antigen presentation by loading of MHC-I molecules and *Irg1* expression, coding for the enzyme producing the antimicrobial metabolite itaconate, was significantly inhibited by L-PolyP.

After all the identified immunosuppressive effects of L-PolyP, efficiency of L-PolyP digestion as a therapeutic approach, was assessed *in vitro* and *in vivo*. In macrophage culture, L-PolyP digestion by recombinant PPX was able to fully suppress the L-PolyP effects on IL-27 secretion. Furthermore, the therapeutic capacity was assessed *in vivo* in a model of CLP-induced sepsis. A one-time therapeutic dose of PPX applied three hours after sepsis induction, significantly reduced mortality of the treated mice as compared to control mice given sodium chloride solution only. Treated mice also died at later time points than control mice.

In order to identify possible receptor candidates, mediating the observed immune modulatory effects of L-PolyP, binding experiments with BMDM whole cell lysates were performed by our work group. Here, these data were analyzed for PolyP-binding proteins identified by mass spectrometry. Furthermore, strongly LPS-regulated and L-PolyP influenced genes were identified by analyzing the existing data sets from RNA-sequencing transcriptomics. By these means, three candidate genes, namely *TMEM206*, *MYADM* and *TMCO1* were identified to be assessed further. Therefore, global knock-out mice for *TMEM206* and *MYADM* were generated using CRISPR/Cas9-mediated genome editing. These newly generated mouse strains were viable and fertile and showed no obvious aberrant bodily phenotypes. IL-27 secretion of *TMEM206*^{-/-} BMDM in response to LPS, however, was significantly increased as compared to wildtype cells. Furthermore, reduced NO productions by these cells as well as reduced phagocytosis capacity was detected. The main immune cell populations expressing *TMEM206* were identified using flow cytometry. Significant *TMEM206* was found only in professional antigen presenting cells (APCs), namely macrophages/BMDMs, B cells and dendritic cells. These findings suggest that *TMEM206* might modulate the inflammatory response *in vitro* and *in vivo*, however, the inhibition of IL-27 as well as the induction of PF4 by L-PolyP were still observed in *TMEM206*^{-/-} BMDM.

For MYADM knock-out animals, significantly reduced transcriptomic levels of the known molecular interactors TGF-beta receptor 2 (TGFBR2) and IL-1 decoy receptor (IL1R2) were found, suggesting an immune modulatory function of MYADM. TMCO1^{-/-} animals showed severely reduced fertility and impaired viability. In an *in vivo* model using LPS-induced endotoxemia, significantly increased concentrations of MIP1- α , MIP1- β , RANTES and IL-10 were found as compared to appropriate control mice, suggesting a function of TMCO1 in regulating the cell-based immune response.

2. Einleitung

2.1. Sepsis

2.1.1. Sepsis – Definition und Ätiologie

Unter Sepsis wird die lebensbedrohliche Organdysfunktion verstanden, die durch eine dysregulierte Immunantwort auf eine Infektion hervorgerufen wird (Singer et al., 2016). Die Sepsis stellt dabei die wohl schwerste Verlaufsform einer akuten Infektion dar (Angus & van der Poll, 2013; Engel et al., 2007). Aufgrund der ihr zugrundeliegenden, systemischen Inflammation, die infolge einer dysregulierten Immunantwort ohne eine entsprechend frühe Behandlung multiple Organschäden zur Folge haben kann, handelt es sich um eine schwerwiegende Erkrankung, die häufig eine intensivmedizinische Betreuung erfordert (Fleischmann et al., 2013). Die Sepsis stellt ein sehr komplexes Krankheitsbild mit überaus variabler klinischer Präsentation dar (Iskander et al., 2013), die unter anderem stark abhängig von der Art des jeweils auslösenden Pathogens (Bakterien, Pilze, Viren) und der Immunkompetenz des Patienten ist (Dolin et al., 2019). Während die Mortalität durch moderne intensivmedizinische Behandlungsmöglichkeiten in den letzten Jahrzehnten in den Industrienationen etwas gesunken ist, steigt die Inzidenz jedoch vermehrt an (Dolin et al., 2008). Insbesondere als problematisch zu bewerten sind in diesem Zusammenhang nosokomiale Infektionen und die häufig mit ihnen einhergehenden Antibiotika-Resistenzen der auslösenden Pathogene (Dolin et al., 2008; George et al., 2018). Aufgrund des unterschiedlichen Verlaufs und der zu erwartenden Prognose ist es wichtig, korrekt zwischen Sepsis und unkomplizierter Infektion zu unterscheiden (Mellhammar et al., 2016). Da jedoch ein verlässlicher Test und aufgrund der Heterogenität der Erkrankung auch verlässliche diagnostische Kriterien schwer zu definieren sind, müssen zur Unterscheidung mehrere Parameter herangezogen werden. Für mehr als 20 Jahre wurden dabei die SIRS- (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*) Kriterien zur klinischen Identifizierung septischer Patienten genutzt (Bone et al., 1992). Aufgrund inadäquater Spezifität und Sensitivität wurden sie jedoch 2016 durch die SOFA- (*Sequential Organ Failure Assessment*) Bewertungskriterien abgelöst (Singer et al., 2016). Aufgrund der Vielzahl klinischer Parameter, die in die SOFA-Bewertung eingehen und der daraus entstehenden Komplexität, die eine schnelle Einschätzung im Klinikalltag nicht erlaubt, wurde zudem der qSOFA (*quick SOFA*) definiert. Dieser soll eine schnelle Patientenbewertung und Prognoseeinschätzung ermöglichen (Singer et al., 2016).

Aufgrund der für Patienten notwendigen, sehr intensiven medizinischen Betreuung, stellt die Sepsis eine erhebliche Herausforderung und Kostenbelastung für die Gesundheitssysteme weltweit dar (Fleischmann et al., 2016). Die in Deutschland erhobenen epidemiologischen Daten zur Sepsis, ihrem jeweiligen Verlauf und den ursächlichen Pathogenen, sind derzeit recht unzureichend. Für das Jahr 2013 wurden jedoch etwa 280.000 Fälle angenommen. Die Mortalität beträgt dabei im Allgemeinen etwa 20 - 50 %. Die jährlichen Kosten für die Gesellschaft werden auf etwa 3,6 – 7,8 Milliarden Euro geschätzt (Angus, 2013; Engel 2007, Levy et al., 2012; Zaffaroni & Peri, 2018).

Der Verlauf der Sepsis wurde in der Literatur häufig als biphasischer Reaktion modelliert, in deren Verlauf es in einer ersten Phase zu einer Immunhyperresponsivität kommt, die in der zweiten Phase durch eine Hyporesponsivität („*immune exhaustion*“) abgelöst wird (Hotchkiss + Karl, 2003). Eine Vielzahl der Sepsistoten wurde dabei in der zweiten Phase verortet, innerhalb der häufig eine Sekundärinfektion für den Tod des Patienten verantwortlich gemacht wurde (Rittirsch et al., 2008).

Genexpressionsanalysen zeigen jedoch, dass keine klare Abgrenzung zwischen pro- und anti-inflammatorischem Geschehen, wie im biphasischen Modell postuliert, zu finden ist.

Vielmehr handelt es sich um ein heterogenes Kontinuum der simultanen Expression pro- und anti-inflammatorische Gene, deren induzierte Immunprogramme miteinander konkurrieren (Denstaedt et al., 2018).

Darüber hinaus ist die induzierte Entzündungsantwort gewebspezifisch. In einem Caecum Ligatur und Punktion (CLP)-Modell der Ratte wurden, bedingt durch unterschiedliche Genexpression, spezifische molekulare Fingerabdrücke für die verschiedenen Organe gefunden. Lediglich ein Bruchteil der untersuchten Gene wurde dabei in allen Organen gleichermaßen exprimiert (Chinnayian et al., 2001). Die Stärke der durch einen inflammatorischen Stimulus induzierten Immunreaktion kann ebenfalls von seiner Lokalisation abhängen. *In-vivo*-Bildgebung LPS-induzierter NF- κ B (*Nuclear factor κ B*)-Aktivierung hat beispielsweise gezeigt, dass intrazelluläre Aktivierung im Vergleich mit anderen Organen verstärkt in Haut, Lunge, Milz und Dünndarm stattfindet (Carlsen et al., 2002).

Ein anderer Prozess, der durch das ursprüngliche, biphasische Sepsismodell nicht ausreichend repräsentiert wird ist das sogenannte *Priming*, das ebenfalls die in Patienten beobachtete, sehr heterogene Ausprägung der Sepsis, erklären kann (Denstaedt et al., 2018). Im Rahmen des *Priming* erfolgt ein erster Insult im Wirt, in dessen Folge weitere Immunantworten entweder verstärkt oder abgeschwächt verlaufen können (Denstaedt et al., 2018). Aus der Literatur ist beispielsweise bekannt, dass eine Femurfraktur vor Durchführung der CLP im Nagetiermodell eine verstärkte Tumornekrosefaktor- α (TNF α)-Freisetzung aus Kupffer-Zellen bedingt, während eine Blutung vor der CLP eine verstärkte Freisetzung sowohl von Interleukin-6 (IL-6) und TNF α zur Folge hat (Suzuki et al., 2006; Huynh et al., 2000). Mäuse mit akutem, mildem Entzündungsgeschehen zeigen hingegen eine reduzierte Mortalität nach *Enterococcus faecalis*-Infektion. Diese Beobachtung konnte auf eine erhöhte IL-12 Produktion und verbesserte Phagozytenfunktion in peritonealen Makrophagen zurückgeführt werden (Takahashi et al., 2004).

2.1.2. Sepsis – Molekulare Pathologie und Cytokinantwort

Die schnelle Erkennung und Beseitigung von in den Körper eindringenden Pathogenen und körperfremden Substanzen ist von besonderer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen und primäre Aufgabe des Immunsystems (Mogensen, 2009). Die Erkennung beruht dabei auf Bindung spezifischer Oberflächenstrukturen der Pathogene, sogenannter PAMPs (*Pathogen associated molecular pattern*) an Mustererkennungsrezeptoren PRRs (*Pattern Recognition Receptor*), die als Teil der angeborenen Immunabwehr exprimiert werden und sowohl an der Plasmamembran als auch endosomal und cytosolisch vorliegen können (Wiersinga et al., 2009). Klassische PAMPs sind beispielsweise das Lipopolysaccharid (LPS) gram-negativer oder die Lipoteichonsäure (LTA) gram-positiver Bakterien. Neben der Erkennung von PAMPs kommt den PRRs auch eine Aufgabe bei der Erkennung endogener Gefahrensignale, sogenannter DAMPs (*Danger-associated molecular patterns*) zu. Klassische DAMPs sind beispielsweise HMGB1 (*High mobility group box 1*), Fibrinogen sowie extrazelluläre DNA und RNA (Wiersinga et al., 2009).

Heute sind vier Typen von PRRs in Vertebraten bekannt: Toll-*like* Rezeptoren (TLRs), NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-*like* Rezeptoren (NLRs), RIG (*retinoic acid-inducible gene-1*)-*like* Rezeptoren (RLRs) und C-Typ Lektin-Rezeptoren (CLRs) (Dowling & Mansell, 2016).

Toll-*like* Rezeptoren (TLR) sind dabei eine sehr gut untersuchte und wichtige Gruppe PRRs, die sowohl Zellmembran-ständig (TLR-1, -2, -4, -5, -6, -10) als auch intrazellulär (TLR-3, -7, -8, -9) lokalisiert vorkommen können und jeweils spezifische PAMPs erkennen (Wiersinga

et al., 2009; Chousterman et al., 2017). TLR13 ist maus-spezifisch und verantwortlich für die Erkennung bakterieller 23 S rRNA (Oldenburg et al., 2012).

Allen TLR gemeinsam ist ihre Signalgebung durch vier Adaptorproteine: MyD88 (*Myeloid differentiation primary response protein 88*), TIRAP (*Toll-Interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein*), TRIF (*TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN- β*) und TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*). Die Signalgebung kann dabei in zwei Hauptwege unterschieden werden, dem MyD88-abhängigen einerseits und dem TRIF-abhängigen Weg andererseits (Kawasaki & Kawai, 2014). TLR-3 greift auf TRIF-abhängige Signalgebung zurück, während alle anderen TLRs MyD88-abhängige Signalgebung nutzen. Der für die LPS-Erkennung zuständige TLR-4 nutzt beide Signalwege. TIRAP stellt eine Verbindung zwischen TLR-2 (LTA-Erkennung) und TLR-4 zu MyD88 her, während TRAM TLR-4 und TRIF verbindet (Wiersinga et al., 2009).

Während TLRs einerseits eine besondere Bedeutung bei der Abwehr bakterieller Infektionen zukommt, spielen sie vermutlich andererseits auch eine große Rolle in der Sepsispathogenese. Dieser Umstand ist damit zu erklären, dass nach erstmaliger Aktivierung eine Selbstverstärkung der Signalgebung durch im Rahmen der Entzündungsreaktion freigesetzte DAMPs denkbar ist, die zu einer Überstimulation der Immunzellen und einer unausgewogenen Cytokinantwort führt, die häufig auch als „Cytokinsturm“ bezeichnet wird (Rittirsch et al., 2008; Wiersinga et al., 2014).

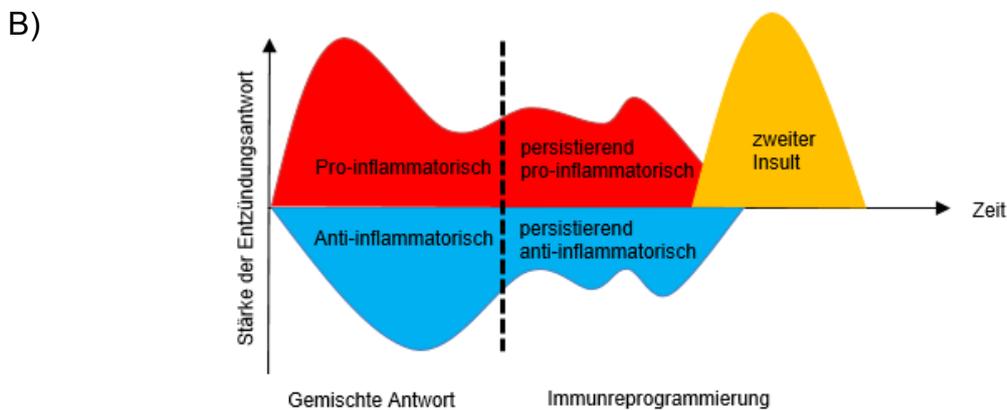
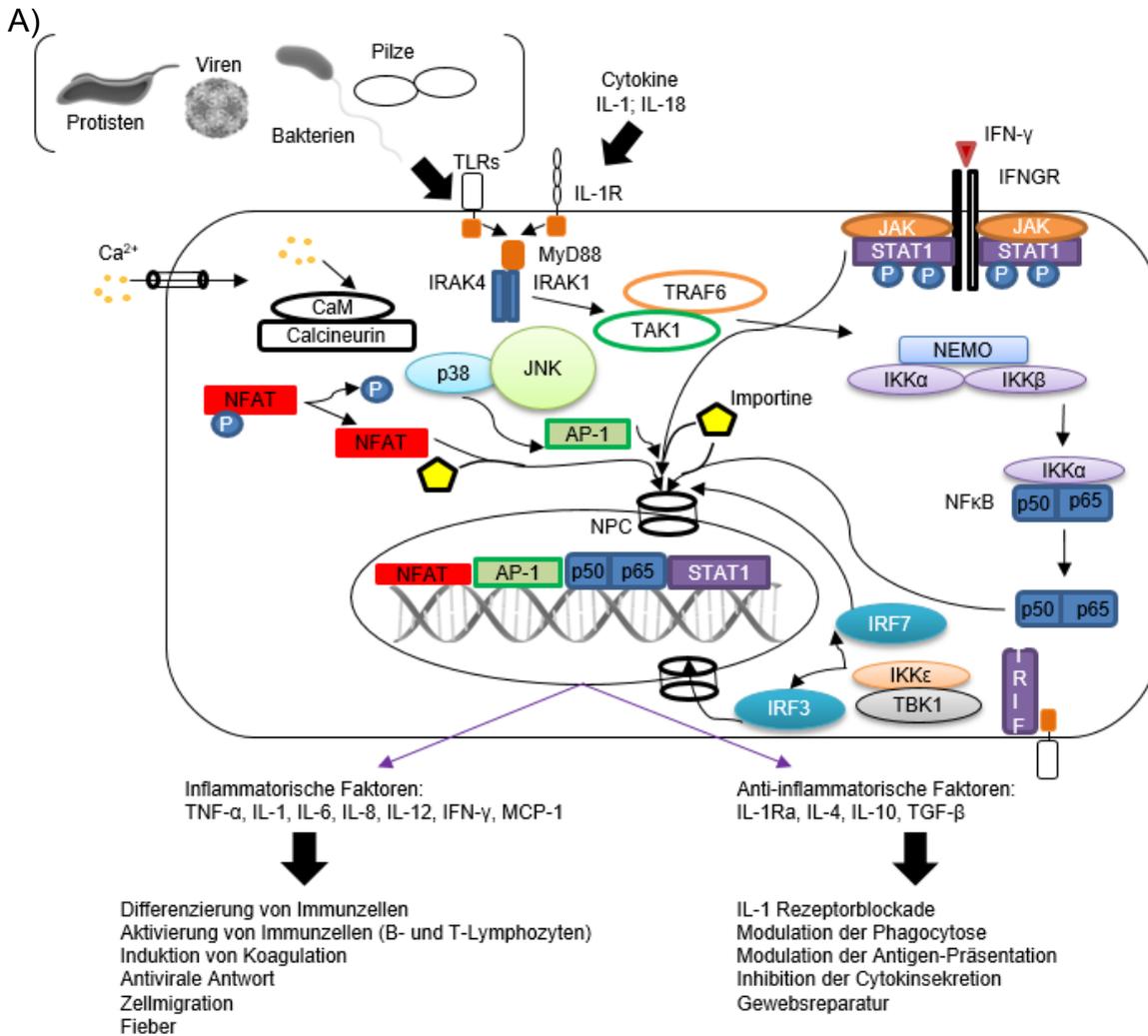


Abb. 1: Zelluläre Signalgebung während Entzündung und Sepsis. A) Eine Vielzahl Pathogen-assoziiertes molekularer Muster wird durch TLRs an der Zelloberfläche oder im endosomalen Weg erkannt. Die Signalgebung der meisten TLRs erfolgt MyD88 abhängig über NF-κB. Sekretierte Cytokine können über die jeweiligen Cytokinrezeptoren auto- und/oder parakrin wirken und auch NF-κB-abhängig die Expression inflammatorischer Faktoren aktivieren. Die Interferon-Signalgebung erfolgt JAK/STAT-abhängig. Auch Calcium-abhängige Signalgebung über CaM/Calcineurin ist in Immunzellen weit verbreitet. Der Importin-abhängige Kerntransport aktivierter Transkriptionsfaktoren durch die Kernpore (*Nuclear Pore Complex*) kann als entscheidender Kontrollpunkt für die nachfolgende Aktivierung der Genexpression gesehen werden. Die Expression pro- und antiinflammatorischer Faktoren steuert das Entzündungsgeschehen, unter anderem die Entfernung des eingedrungenen Pathogens sowie die Auflösung des im Rahmen der Entzündungsreaktion eingetretenen Gewebsschadens.

Fortsetzung Abb. 1:

B) Die Sepsis ist als ein Prozess zu verstehen, in dem pro- und antiinflammatorische Prozesse simultan ablaufen und nicht strikt voneinander zu trennen sind. Nach der ersten Antwort persistierende Prozesse können zu einer Immunreprogrammierung führen, die auch ein *Priming* für eine zweite Antwort zur Folge haben kann. Adaptiert nach: Denstaedt et al., 2018; Veach et al., 2017/Hawiger, 2018.

CaM: Calmodulin, IFN: Interferon, IFNGR Interferon- γ Rezeptor, IKK: Inhibitor of NF κ B kinase, IRAK: Interleukin-1 receptor-associated *kinase 1*, JAK: Januskinase, JNK: c-Jun N-terminale Kinase, MCP1: *monocyte chemotactic protein 1* (CCL2), MyD88: *Myeloid differentiation primary response 88*, NEMO: *NF-kappa-B essential modulator*, NPC: *Nuclear Pore Complex*, STAT1: Signal transducer and activator of transcription, TAK1: *Transforming growth factor beta-activated kinase 1*, TRAF6: *TNF receptor associated factor*.

Als besonders interessante Mittelpunkte in der Immunpathogenese der Sepsis wurden indes mehrere Signalmoleküle identifiziert und in der Literatur ausführlich beschrieben:

C5a ist eine Komponente des Komplementsystems, das als Teil der angeborenen Immunantwort in den ersten Phasen der Sepsisentstehung aktiviert wird. C5a ist jedoch auch ein starkes Anaphylatoxin und wirkt als Modulator der Gerinnungskaskade, der TLR-Signalgebung und der Cytokinfreisetzung (Hawlich et al., 2005; Bosmann et al., 2012). Die synergistische, inflammatorische Interaktion zwischen TLRs und dem C5a-Anaphylatoxinrezeptor (C5aR, CD88) ist bereits seit längerem aus der Literatur bekannt (Holst et al., 2011; Okusawa et al., 1987).

Die Sekretion von MIF (*Macrophage migration-inhibitory factor*), eines der ersten identifizierten, pro-inflammatorischen Cytokine, wird ebenfalls durch C5a reguliert. Es verstärkt die Prozesse adaptiver und angeborener Immunabwehr durch Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen und erhöht die TLR-4 Expression in Phagozyten. Zudem antagonisiert es die anti-inflammatorischen Effekte endogener Steroide (Calandra & Bucala, 1997; Matsuda & Hattori, 2006).

High mobility group box 1 (HMGB1) wurde ursprünglich als Transkriptionsfaktor beschrieben und wird in allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Die Freisetzung kann aus Immunzellen - vor allem aus Makrophagen, Monocyten und Neutrophilen - nach Acetylierung im Zellkern erfolgen. Auch nekrotische Zellen setzen HMGB1 frei. Aktive HMGB1-Sekretion durch Immunzellen ist durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert. Extrazelluläres HMGB1 bindet als DAMP an TLR-2 und TLR-4 sowie RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End products*) und erhöht die pro-inflammatorische Kapazität anderer Cytokine und fördert die Cytokinsekretion (Feng et al., 2016; Garcia-Arnandis et al., 2010). Darüber hinaus wurde HMGB1 mit der, im Rahmen der Sepsis beobachteten, Disruption epithelialer Barrieren in Verbindung gebracht. Blockade von RAGE oder HMGB1 führte zu einem verbesserten Überleben in Endotoxämie und experimenteller Sepsis (Liljensiek et al., 2004; Rittirsch et al., 2008).

Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), auch bekannt als CC Chemokin-Ligand 2 (CCL2) gehört wie PF4/CXCL4 und IP-10/CXCL10 zur Gruppe der Chemokine. Bei Chemokinen handelt es sich um kleine, 8-10 kDa große Proteine, die zwei Subfamilien, den CXC und CC Chemokinen, zugeordnet werden können. In der Subfamilie der CXC Chemokine sind die ersten zwei Cysteine-Reste der Peptidsequenz durch eine andere Aminosäure separiert, während diese in CC Cytokinen benachbart stehen. Während CXC Chemokine typischerweise chemotaktisch auf Neutrophile wirken, locken CC Chemokine vermehrt Mononukleäre Zellen an und aktivieren diese (Luster, 1998; Ramnath et al., 2007). CCL2 zeigt seine potenteste chemotaktische Aktivität gegenüber Monozyten (Lu et al., 1998; Ugucioni et al., 1995). Studien konnten eine klare Rolle von MCP-1/CCL2 in der

Pathogenese Makrophagen-getriebener, entzündlicher Erkrankungen wie Artherosklerose zeigen. In der Sepsis und lethalen Endotoxämie haben mehrere Studien MCP-1 mit einer protektiven Wirkung assoziiert (Matsukawa et al., 1999; Zisman et al., 1997). Behandlung mit rekombinantem MCP-1 verbesserte die Elimination der bakteriellen Pathogene und schützte Mäuse gegen systemische Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella typhimurium*. Blockade von MCP-1 durch Vorbehandlung der Tiere mit Anti-MCP-1 Antikörpern hingegen führte zu einer gestörten Beseitigung der Bakterien sowie reduzierte Leukozytenrekrutierung im Rahmen der peritonealen Sepsis (Gerard & Rollins, 2001; Nakano et al., 1994; Matsukawa et al., 1999, Zisman et al., 1997). Trotz dieser Vielzahl protektiver Befunde konnten weitere (Overhaus et al., 2006; Taub, 1996), und insbesondere eine neuere Studie mit Bindarit, einem Blocker der MCP-1 Synthese in murinen Modellen der Sepsis und Endotoxämie, sowohl therapeutisch als auch prophylaktisch einen insbesondere organprotektiven Effekt zeigen. Die Behandlung mit Bindarit führte dabei zu einer Dämpfung der Neutrophilenrekrutierung in Lunge und Leber, die mit einer verringerten Lungen- und Leberschädigung im Rahmen CLP-induzierter Sepsis und LPS-induzierter Endotoxämie assoziiert werden konnte (Ramnath et al., 2008).

Platelet factor 4 (PF4, auch CXCL4) ist ein in den α -Granula von Thrombozyten gespeichertes Protein. In der Literatur wurden bereits vielfältige pro-thrombotische, pro-inflammatorische und antimikrobielle Aktivitäten für dieses Protein beschrieben (Brandt et al., 2000; Middleton et al., 2016; Vieira-de-Abreu et al., 2012). Heterodimerbildung von PF4 und RANTES/CCL-5 (*Regulated Upon Activation, Normally T-Expressed, And Presumably Secreted*) wurde im murinen Modell des LPS-induzierten Lungenschadens beobachtet. Neutralisation der Cytokine durch Antikörper oder das Unterbinden der Heterodimerisierung mittels eines inhibitorischen Peptids reduziert die Neutrophilen-Akkumulation in der Lunge sowie den Verlust der Kapillarintegrität (Grommes et al., 2012). Die Neutrophilen-Aktivierung durch RANTES/PF4-Heterodimere induziert auch die Bildung antimikrobieller, neutrophiler extrazellulärer Fallen (*neutrophil extracellular traps*, NETs) (Rossaint et al., 2014). Darüber hinaus ist bekannt, dass PF4 die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen fördert und befähigt ist, eine spezifische Transkriptomsignatur in Makrophagen zu induzieren (Gleissner et al., 2010a) sowie Oberflächenrezeptoren, wie den artheroprotektiven Hämoglobinrezeptor CD163, in humanen Makrophagen herunterzuregulieren (Gleissner et al., 2010b).

Gamma interferon-inducible protein-10 (IP-10), auch bekannt als CXC Ligand 10 (CXCL10), ist ein CXC Chemokin, das als Antwort auf Typ I (IFN- α und IFN- β) und Typ II (IFN- γ) Interferon (IFN)-Stimulation sekretiert wird (Fitzgerald et al., 2003; Takeda & Akira, 2004). Mehrere Studien konnten eine Verbindung zwischen CXCL10 und produktiven Th1-Zellantworten herstellen. Darüber hinaus konnte CXCL10 mit der Neutrophileninfiltration und -funktion assoziiert werden (Kelly-Scumpia et al., 2010; Singh et al., 2007; Singh et al., 2008). Cuenca et al haben gezeigt, dass der Influx von Granulozyten und Makrophagen in die Bauchhöhle im Rahmen polymikrobieller Sepsis mit einer temporären Erhöhung der peritonealen CXCL10-Konzentration assoziiert ist. Die Blockade von CXCL10 führt zu einer signifikanten Reduktion des Zellinfluxes und der phagozytischen Aktivität peritonealer Granulozyten und bedingt dadurch ein verschlechtertes Überleben (Cuenca et al., 2011). Die Typ I-Interferonantwort ist ein kritischer Faktor der Wirtsimmunität im Kampf gegen Virusinfektionen und andere intrazelluläre Pathogene (Stetson & Medzhitov, 2006). Trotz der Wichtigkeit dieses immunologischen Pfads im Rahmen der phagozytischen Zellantwort, zeigen Interferon- α/β -Rezeptor (IFNAR)-defiziente Mäuse einen Überlebensvorteil im Rahmen von Endotoxämie und hochletalen, bakteriellen Infektionen. Auch pharmakologische Inhibition von IFNAR1-Signalgebung wirkt gegenüber einem endotoxischen Schock protektiv und verbessert das Überleben im CLP-Modell (Dejager et

al., 2013). Kelly-Scumpia berichteten jedoch im Rahmen eines CLP-Modells mit geringem Schweregrad, trotz erhöhter Endotoxinresistenz der IFNAR^{-/-} Tiere von einer erhöhten Mortalität (Kelly-Scumpia et al., 2010). Dieser Umstand konnte mit erhöhten peritonealen Bakterientitern und reduzierter Neutrophilenchemotaxis und Neutrophilenphagozytose korreliert werden. CXCL10-Behandlung der IFNAR^{-/-} Tiere führte zu einer Verbesserung des experimentellen Überlebens und einer Reduktion der peritonealen Bakterienlast (Kelly-Scumpia et al., 2010). CXCL10 ist demnach als kritischer Faktor der Wirtsantwort während polymikrobieller Sepsis einzuordnen.

Interleukin-27 (IL-27), ein Cytokin der IL-12 Cytokinfamilie, ist ein heterodimeres Cytokin, das aus den Untereinheiten IL-27p28 und *Epstein-Barr virus-induced gene 3* (EBI3) besteht. Die Sekretion erfolgt primär durch stimulierte Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie Makrophagen und Dendritische Zellen (DCs) (Aparicio-Siegmund & Garbers, 2015; Bosmann et al., 2014; Hunter & Kastelein, 2012). Die zelluläre Signalgebung erfolgt über Bindung an den IL-27 Rezeptorkomplex (IL-27R), der sich aus den Untereinheiten IL-27Ra (WSX1) und Glykoprotein 130 (gp130) zusammensetzt. Das Cytokin weist sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften auf. IL-27RA-defiziente Mäuse zeigen beispielsweise eine letale T-Zell-vermittelte Entzündungsreaktion sowie eine überschießende Cytokin-Produktion infolge einer Protozoen-Infektion (Kastelein et al., 2003; Hamano et al., 2003). Darüber hinaus konnte IL-27 ebenfalls experimentell mit einer Vielzahl akuter und chronisch entzündlicher Erkrankungen assoziiert werden, darunter auch die Sepsis (Duan et al., 2015; Neurath, 2007; Wynick et al., 2014). Dabei konnte eine erhöhte IL-27 Expression in septischen Mäusen und Menschen nachgewiesen werden, deren Stärke mit dem klinischen Schweregrad und der Mortalität korreliert werden konnte. Blockade von IL-27 via Administration eines löslichen IL-27RA-Fc-Fusionsproteins führte zu einem verbesserten Überleben nach Peritonitis-induzierter Sepsis (Wirtz et al., 2006). IL-27 stimuliert Monocyten, Langerhans Zellen, Mastzellen, Keratinocyten und Epithelzellen zur Produktion pro-inflammatorischer Cytokine wie TNF- α , MIP-1 α/β , IL-1 β und IL-6 (Wittman et al., 2009; Cao et al., 2010). Seine wichtige immunmodulatorische Funktion resultiert aus der Suppression der Entwicklung von Th1, Th2 and Th17-Zellen sowie der Induktion regulatorischer T-Zellen, in denen die Produktion des anti-inflammatorischen Cytokins IL-10 induziert wird (Awasthi et al., 2010).

Aufgrund der massiven Immunantwort unter Freisetzung einer Vielzahl pro-inflammatorischer Cytokine („Cytokinsturm“) können multiple Organschäden durch ein Portfolio unterschiedlicher pathologischer Mechanismen eintreten (Markwart et al., 2014). Durch Aktivierung des Komplementsystems und der angeborenen, zellulären Immunabwehr mit verstärkter Cytokin- und Chemokin-Sekretion, der Freisetzung von Komplement-Spaltprodukten sowie sekundärer Mediatoren wie Lipid-Faktoren und reaktiver Sauerstoffspezies kann es zu einer Selbstverstärkung und anschließenden Überaktivierung der Immunreaktion kommen. In der Folge treten Organschäden durch Bildung extrazellulärer Fallen (NETs), (Mikro)Thrombenbildung, Schädigung des vaskulären Endothels, mikrovaskuläre Dysfunktion, Störung der Hämodynamik mit kardiovaskulärer Überbeanspruchung und myokardialer Dysfunktion, ein (De Geer et al., 2015; Ellrodt et al., 1985; Greco et al., 2017; Markwart et al., 2014; Parker et al., 1984; Rittirsch et al., 2008; Samuels et al., 2018).

Durch die induzierten Gewebs- und Endothelschäden wird darüber hinaus die Blutgerinnung weiter gefördert, sodass es systemisch zu einer Verbrauchskoagulopathie, mit insgesamt erhöhter Blutungsneigung des betroffenen Patienten, kommen kann (Rittirsch et al., 2008). Aufgrund der Freisetzung von DAMPs aus nekrotischen Zellen handelt es sich auch um einen selbstverstärkenden Prozess. Durch Dysfunktion des vaskulären Endothels und Austritt großer Flüssigkeitsmengen in das umliegende Gewebe kommt es darüber hinaus

auch zu Ödembildung und Blutdruckabfall. Durch den Blutvolumenverlust kann es zum Eintritt eines Schockzustandes kommen (Donati et al., 2013; Ince et al., 2016; Rubio-Gayosso et al., 2006;).

Für Behandlungsstrategien, die eine Inhibition der starken inflammatorischen Antwort in der Sepsis zum Ziel hatten, konnten jedoch bisher keine bleibenden, klinischen Erfolge nachgewiesen werden. Auch für aktiviertes Protein C, das zeitweise als Sepsistherapeutikum zugelassen war, konnte eine protektive Wirkung in klinischen Studien nicht mit ausreichender Signifikanz belegen (Abraham et al., 2005; Nadel et al., 2007; Pappalardo et al., 2016). Das Scheitern dieser Ansätze ist vermutlich auf die sehr variable Charakteristik dieses Krankheitsgeschehens, mit simultan stattfindenden pro- und anti-inflammatorischen Prozessen, zurückzuführen. Klinisch ist insbesondere die auf eine überstandene Sepsis folgende Phase der Immunsuppression problematisch. Hierfür wurden inzwischen neuartige immuntherapeutische Ansätze wie die CAR-T-Zelltherapie (*chimeric antigen receptor*) vorgeschlagen (Patil et al., 2016).

2.1.3 Sepsis - gegenwärtige Behandlungsansätze

Die Grundbausteine der Sepsis-Behandlung haben sich seit den 1960er Jahren kaum verändert (Heming et al., 2016). Der schnellen Einleitung einer antibiotischen Behandlung sowie der umgehenden chirurgischen Sanierung von Infektionsherden (z.B. Abszessen und infizierten Implantaten) kommt nach wie vor eine große Bedeutung zu (Marshall et al., 2004). Darüber hinaus ist eine angemessene Gewebesperfusion und -oxygenierung im Rahmen der intensivmedizinischen Behandlung zu gewährleisten. Zur hämodynamischen Optimierung können Kristalloide gegeben werden. Zusätzlich werden die Laktatwerte überwacht, um den Eintritt einer Azidose frühzeitig entgegenwirken zu können. Hämodynamische Dysfunktionen können indes durch die Gabe von Vasopressoren kompensiert werden. Für Patienten mit septischem Schock, die schlecht auf Flüssigkeitssubstitution und Vasopressortherapie ansprechen, kann die intravenöse Gabe von Hydrocortison ratsam sein (Dellinger et al., 2013). Letzteres wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert (Gibbison et al., 2017).

Die medikamentöse Therapie der Sepsis, abgesehen von der etablierten Therapie mit Breitspektrum-Antibiotika und Vasopressoren, hat bisher wenig vielversprechende Resultate geliefert. Mit Drotegrocina alfa (Xigris®), einem rekombinanten Protein C Analog, war unter anderem in der EU und den USA ab 2001 erstmals ein Medikament zur Therapie der schweren Sepsis zugelassen. Allerdings konnte die Effektivität der Therapie im Rahmen weiterer, nachfolgender Studien, nicht bewiesen werden (Abraham et al., 2005; Nadel et al., 2007; Pappalardo et al., 2016). Das Produkt wurde deshalb 2011 vom Markt genommen (Lilly, 2011; Ranieri et al., 2012). Derzeitige Therapieansätze fokussieren sich auf drei Schwerpunkte: a) Die Entfernung immunaktiver, bakterieller Produkte aus der Blutzirkulation zur Dämpfung der über PRR aktivierten Immunreaktion, b) Die Immuntherapie zur situationsabhängigen Stimulation oder Dämpfung der Immunreaktion, c) Andere medikamentöse Behandlungsformen, die auch auf den Metabolismus der Endorgane abzielen, um die funktionelle Organdysfunktion zu vermeiden (Heming et al., 2016).

Die Entfernung von LPS aus der Zirkulation kann beispielsweise durch Dialyse unter Nutzung von Polymyxin B-gekoppelten Fasern erreicht werden. Eine erste Studie mit dieser Methode berichtete im Rahmen der abdominalen Sepsis von verbesserter Hämodynamik, reduzierter Organdysfunktion und verringerter 28-Tage Mortalität (Cruz et al., 2009). Die Therapie der Sepsis mit TLR-4 Antagonisten wie Eritoran und TAK-242 zeigte jedoch sowohl

im Rahmen von In-vivo-Versuchen mit Mäusen als auch in klinischen Studien keine Wirksamkeit (Opal et al., 2013; Rice et al., 2010; Takashima et al., 2009).

Die Immuntherapie kann beispielsweise durch Gabe von GM-CSF erfolgen. GM-CSF könnte die Immunresponsivität in Patienten mit Sepsis-assoziiertes Immunparalyse wiederherstellen (Heming et al., 2016). Darüber hinaus ist die Gabe von Corticosteroiden im Rahmen eines septischen Schocks möglich (Dellinger et al., 2012). Niedrige Dosen Hydrocortison reduzieren die Neutrophilaktivierung und die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine (Keh et al., 2003). Ein weiterer Ansatzpunkt ist der Transfer mesenchymaler Stammzellen, für die tierexperimentell gezeigt wurde, dass sie fähig sind, die Entzündungsreaktion abzuschwächen und das Überleben in Tiermodellen der CLP und des akuten Lungenschadens zu verbessern (Mei et al., 2010; Pedrazza et al., 2017). Die Kontrolle der Komplementaktivierung könnte sich ebenfalls als ein vielversprechender Ansatzpunkt erweisen. In Tiermodellen wurde gezeigt, dass die Blockade von C5, C5a oder der entsprechenden Komplement-Rezeptoren, die Plasmakonzentration von HMGB1 senken und das Überleben im Rahmen der experimentellen Sepsis verbessern kann (Czermak et al., 1995; Rittirsch et al., 2008)

Andere Behandlungsansätze zielen beispielsweise auf die Gabe von Thrombomodulin, das sowohl gerinnungshemmende als auch anti-inflammatorische Effekte zeigt (Abeyama et al., 2005; Shi et al., 2008). Die gerinnungshemmende Eigenschaft ist auf eine Reduktion der Thrombin-vermittelten Gerinnung zurückzuführen. Die anti-inflammatorischen Effekte können auf die Inhibition der Komplementaktivierung und Inaktivierung von HMGB1 zurückgeführt werden (Abeyama et al., 2005; Shi et al., 2008). Beta-Blocker können zusätzlich bei der Unterbrechung der andauernden adrenergen Stimulation helfen. Selektive Blockade der β_1 -Rezeptoren kann zur Reduktion der Sepsis-induzierten kardiovaskulären, metabolischen, immunologischen und hämostatischen Veränderungen beitragen. Im Tiermodell konnte der Beta-Blocker Esmolol die Entzündungsantwort effektiv dämpfen und die Überlebensraten dadurch erhöhen (Ibrahim-Zada et al., 2014; Mori et al., 2011; Suzuki et al., 2005). Randomisierte Humanstudien konnten zeigen, dass Esmolol die Herzschlagrate effektiv reduzieren und das Schlagvolumen erhöhen konnte. Darüber hinaus wurden deutlich erhöhte Überlebensraten gegenüber der Kontrollgruppe berichtet (Morelli et al., 2013).

Auch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase bietet eine Option, zumindest LPS-vermittelte Effekte in der Sepsis zu mildern. Die Dephosphorylierung von LPS reduziert seine toxischen Eigenschaften (Poelstra et al., 1997). Der Befund erhöhter alkalischer Phosphatase-Konzentrationen in der Niere nach Endotoxin-Stimulus wurde dabei als entsprechende adaptive Reaktion beschrieben. In Tiermodellen konnte die Applikation von alkalischer Phosphatase die Entzündungsreaktion dämpfen und führte zu einem verbesserten Überleben der behandelten Tiere (Beumer et al., 2003; Su et al., 2006).

2.2. Anorganische Polyphosphate

2.2.1. Anorganische Polyphosphate in Prokaryoten, Protisten und höheren Eukaryoten

Anorganische Polyphosphate (PolyP) sind polyanionische, lineare Homopolymere von mindestens drei bis zu mehr als 1000 Phosphateinheiten Länge. Die einzelnen Orthophosphateinheiten sind dabei durch Phosphoanhydridbindungen kovalent miteinander verknüpft (Abb. 2) (Kumble & Kornberg, 1995). Polyphosphate kommen ubiquitär in der Umwelt vor, speziell an extremen Orten wie Vulkanschloten und in der Tiefsee (Brown & Kornberg, 2004; Xie & Jakob., 2019). Synthetisch können sie durch Dehydratation von Orthophosphaten bei hoher Temperatur hergestellt werden (Achbergerova et al., 2011). Aufgrund ihres Vorkommens in extremen ökologischen Nischen wurden PolyP als polyanionische Anker-moleküle für die Assemblierung komplexer Makromoleküle in den Anfängen der Entstehung komplexer Stoffwechselwege in Betracht gezogen (Kornberg et al., 1999; Wang et al, 2018).

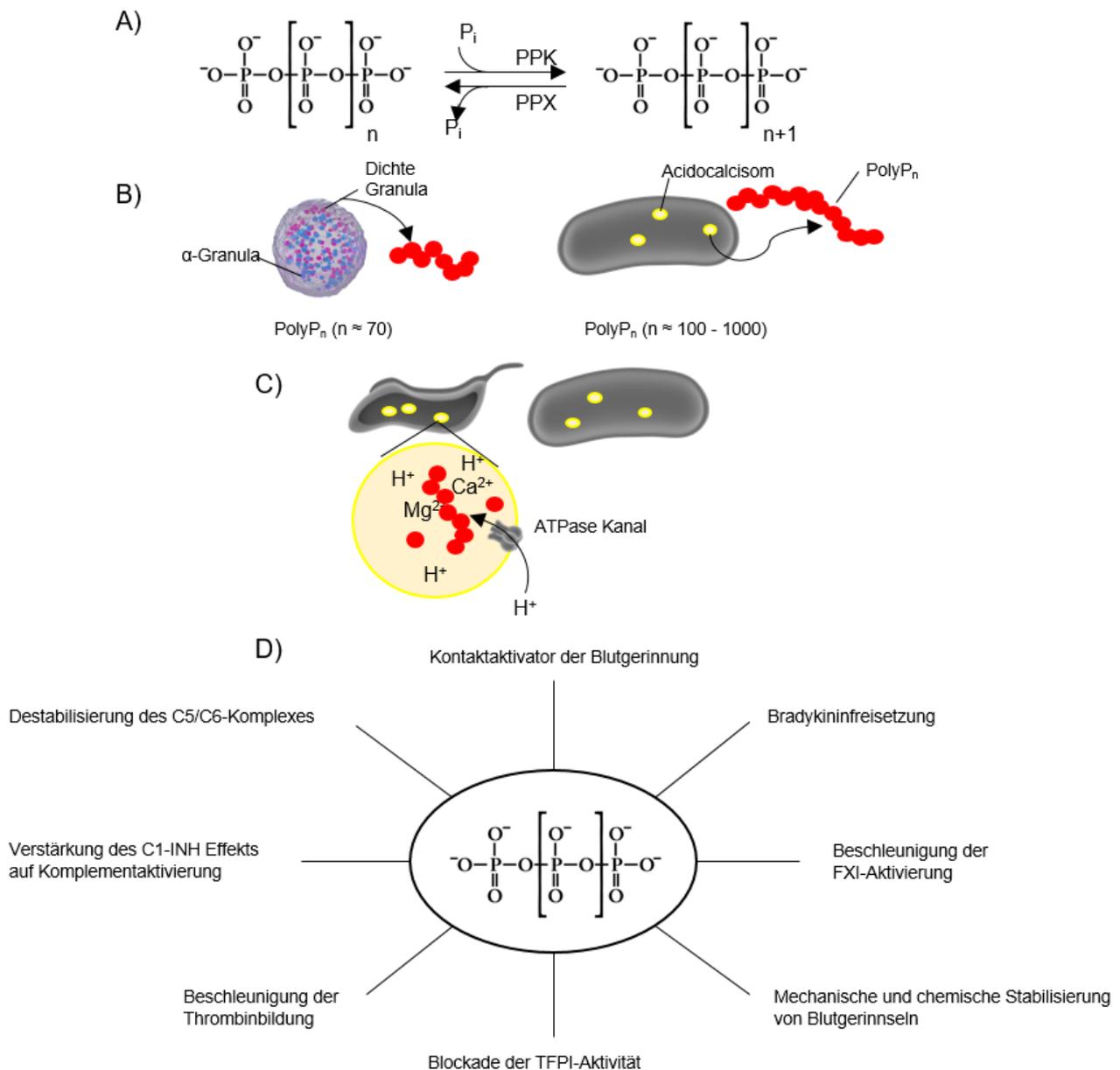


Abb. 2: Biochemische Eigenschaften und Funktionen von Polyphosphat. A) Enzymatischer Auf- und Abbau von Polyphosphaten in Bakterien. Die Kettenverlängerung erfolgt durch Polyphosphatkinase unter Transfer der terminalen Phosphatgruppe eines ATP-Moleküls. Der Kettenabbau erfolgt durch Exopolyphosphataseaktivität. B) Größenunterschiede von Polyphosphaten in Thrombozyten und Bakterien. Während die in Plättchen lokalisierten Polyphosphate eine mittlere Kettenlänge von etwa 70 Monophosphateneinheiten besitzen, bestehen die bakteriellen Polyphosphate aus bis zu 1000 Monomereinheiten. C) Zelluläre Lokalisation von Polyphosphaten in Bakterien und Trypanosomen. Spezialisierte Organellen, Acidocalcisomen genannt, dienen zur Speicherung der Polyphosphate. In diesen Organellen liegen hohe Polyphosphatkonzentrationen in Komplexen mit den zweiwertigen Kationen Calcium und Magnesium vor. Die Organellen werden durch ATPase-Aktivitäten stark angesäuert. D) Funktionen von PolyP bei Blutgerinnung und Komplementaktivierung. Adaptiert nach: Baker et al., 2019. ATP: Adenosintriphosphat, FXI: Gerinnungsfaktor XI, L-PolyP: langkettiges Polyphosphat, Pi: anorganisches Phosphat, PPK: Polyphosphatkinase, PPX: Exopolyphosphatase, TFPI: *Tissue factor pathway inhibitor*, C1-INH: C1 Inhibitor, vWF: von Willebrand-Faktor

Neben seiner ubiquitären Anwesenheit in der Umwelt wurde PolyP auch in allen bisher untersuchten Zellen und Organellen von Bakterien bis höheren Eukaryoten gefunden (Kornberg et al., 1999).

Acidocalcisomen sind spezialisierte Zellorganellen für die Speicherung von PolyP, die zuerst in den parasitischen Protisten *Trypanosoma brucei* und *T. cruzi*, Erregern der Schlaf- beziehungsweise Chagaskrankheit, beschrieben wurden (Moreno & Docampo, 2009). Sie erscheinen im Elektronenmikroskop elektronendicht (Docampo et al., 2005), sind PolyP- und Kationen-reich und werden durch Protonenpumpenaktivität angesäuert (Docampo + Huang, 2016; Vercesi et al., 1994; Docampo et al., 1995). Neben ihrem Vorkommen in pathogenen Protisten wurden Acidocalcisomen auch in Bakterien, sowie in ein- und vielzelligen Eukaryoten beschrieben. In Bakterien wurden diese Speicher vormals auch als Volutin-Granula oder metachromatische Granula bezeichnet (Babes, 1895; Docampo et al., 2005, Docampo et al., 2010). Die Dichten Granula der Plättchen sowie die sekretorischen Granula der Mastzellen von Säugetieren zeigen ähnliche Charakteristika wie die Acidocalcisomen der Protisten (Docampo & Huang, 2016; Moreno-Sanchez et al., 2012; Ruiz et al., 2004).

In Bakterien wurde PolyP bereits mit Zellmotilität, *quorum sensing*, Biofilm-Bildung, der Antwort gegenüber thermischem, alkalischem, osmotischem und oxidativem Stress sowie dem Überleben in der stationären Phase in Verbindung gebracht (Bashatwah et al., 2013; Candon et al., 2007). Die Kettenlänge der von Mikroorganismen synthetisierten PolyP kann dabei mehr als 1000 Orthophosphateinheiten betragen (Kornberg et al., 1999).

Synthese und Degradation von PolyP erfolgen enzymatisch. Der Aufbau von PolyP wird dabei durch Polyphosphatkinasen (PPKn) unter Verwendung von Adenosintriphosphat (ATP) katalysiert. Die meisten Bakterien codieren sowohl PPK1 als auch PPK2, wobei jedoch PPK1 das Primärenzym für die PolyP-Synthese in vielen Bakterienspezies darstellt (Hassanian et al., 2016; Zhang et al., 2002). Die Kettenverlängerung erfolgt dabei durch Transfer der terminalen Phosphatgruppe eines ATP-Moleküls auf die wachsende PolyP-Kette. Während PPK1 die Synthese von PolyP favorisiert, katalysiert PPK2 vermehrt die Bildung des Nucleosidtriphosphats Guanosintriphosphat (GTP) unter Nutzung von PolyP als Phosphatgruppendonator. Die Rückreaktion der PPK2, also die Bildung von PolyP unter Verwendung von GTP, ist mehr als 75-fach langsamer als die zuvor betrachtete GTP-Bildung (Zhang et al., 2002).

Enzymatischer Abbau von PolyP wird durch Exo- und Endopolyphosphatasen katalysiert. Während Exopolyphosphatasen (PPXn) terminale Phosphatgruppen von der Polymerkette entfernen, hydrolysieren Endopolyphosphatasen innerhalb der Kette und führen so zu seiner Fragmentierung (Lonetti et al., 2011).

E. coli nutzt den PolyP-Metabolismus als Adaptationsmechanismus gegenüber Nährstoffmangel und Umweltstress sowie als Phosphatgruppenreservoir (Ault-Riche et al., 1998; Hassanian et al., 2016; Irr, 1972). Die physiologische Bedeutung von PolyP in *E. coli* konnte durch Generierung von PPK-Knock-outs gezeigt werden. Diese Zellen sind, unter definierten Bedingungen, nach Stressinduktion (Nährstoffmangel, oxidativer Insult, UV-Bestrahlung) nur für wenige Tage lebensfähig, während Wildtypzellen diese Stressoren bis zu einem gewissen Grad adaptiv kompensieren können (Shiba et al., 1997).

Neben seiner Funktion als zellulärer Phosphatgruppen- und Energiespeicher ist PolyP als Polyanion ein starker Metallionen-Chelator. In den durch Protonenpumpenaktivität angesäuerten Acidocalcisomen liegen beispielsweise hohe Konzentrationen PolyP mit Calcium-Ionen assoziiert vor, woraus auch die Namensgebung dieses Organells resultiert (Docampo et al., 2005; Docampo et al., 2010). Chelation von Metallionen kann auch ihre toxische Wirkung, beispielsweise durch Radikalbildung, inhibieren. Beispielsweise kann PolyP-gebundenes Mn^{2+} die Dismutation des Superoxid-Radikals in *Lactobacillus plantarum* katalysieren (Archibald & Fridovich, 1982; Hassanian et al., 2016). Aufgrund seiner starken negativen Ladung ist PolyP auch zur Bindung an kationische DNA-bindende Proteine, u.a. Histone, befähigt. Es wird vermutet, dass solche Interaktionen Genexpression

in Bakterien regulieren könnten (Hassanian et al., 2016). Darüber hinaus wurde PolyP 2014 als mutmaßlich urzeitliches, anorganisches Chaperon beschrieben, das unter Stressbedingungen mißgefaltete Proteine sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in faltungskompetenter Form erhält und eine Aggregation verhindert (Gray et al., 2014).

PolyP mit 60 bis 100 Phosphateinheiten Länge können in hoher Konzentration in den δ -Granula humaner Thrombozyten gefunden werden (Ruiz et al., 2004) und werden nach Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin oder andere physiologische Stimuli in die Blutzirkulation exocytiert. PolyP fungiert dabei als prokoagulativer Faktor, der die Thrombinbildung durch sowohl extrinsischem als auch intrinsischem Weg der Gerinnung fördert (Biswas et al., 2018). Dabei bietet das anionische Polymer eine molekulare Plattform, an die Gerinnungsfaktoren beider Wege assemblieren können, wodurch die Gerinnung gefördert wird (Smith + Morrissey, 2008; Choi et al./Morrissey, 2011). Störungen in diesen Granula wie sie beispielsweise beim Hermansky-Pudlak-Syndrom gefunden werden (Weitz & Fredenburgh, 2017), führen zu einer Reduktion der PolyP-Konzentration mit einer damit einhergehenden erhöhten Blutungsneigung (Hassanian et al., 2017; Niewenhuis et al., 1987; Hernandez-Ruiz et al., 2009). PolyP moduliert die Gerinnungskaskade an verschiedenen Stellen: a) es aktiviert den Kontakt-Weg, b) beschleunigt die Aktivierung von Faktor (F) V durch FXa, Thrombin oder FXIa, c) es inkorporiert in das Fibringerüst und stabilisiert die Gerinnselstruktur, d) es erhöht die Stabilität des gebildeten Gerinnsels gegenüber Fibrinolyse, e) es inhibiert die gerinnungshemmende Funktion des *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) (Choi et al., 2011; Choi et al., 2014; Muller et al., 2009; Mutch et al., 2010; Smith et al., 2006; Smith & Morissey, 2008; Smith et al., 2010). PolyP-Inhibitoren werden daher als neue antikoagulative Medikamente erforscht und könnten geringere Nebenwirkungen aufweisen als konventionelle Gerinnungshemmer (Hassanian et al., 2017).

Neben ihrer Lokalisation in den δ -Granula von Säugetieren, wurde PolyP auch in Zellkern, Mitochondrien, Lysosomen und sekretorischen Granula von Mastzellen und Basophilen gefunden (Moreno-Sanchez, 2012; Kumble + Kornberg, 1995, Pisoni + Lindley, 1992). Trotz ihrer Identifizierung und Quantifizierung in Säugetierzellen sind die für Synthese und Degradation von PolyP in diesen Zellen verantwortlichen enzymatischen Systeme bisher nicht aufgeklärt worden (Livermore et al., 2016). Das einzige bisher bekannte, mit PolyP-Synthese assoziierte, prokaryotische Enzym mit eukaryotischem Homolog ist PPK1. Die Hefe *Candida humicola* codiert beispielsweise für ein Enzym mit 34 % Sequenzidentität zu *Helicobacter pylori* PPK1. Auch in der Amoebe *Dictyostelium discoideum* wurde ein PPK1-Homolog mit Ähnlichkeit zur *E. coli* PPK1 gefunden (Brown & Kornberg, 2004 & 2008; Rao et al., 2009; Moreno & Docampo, 2013).

2.2.2. Anorganische Polyphosphate in Entzündung und als mikrobielle Pathogenitätsfaktoren

Es ist bekannt, dass PolyP als Durabilitäts- und Pathogenitätsfaktor in einigen Pathogenen eine entscheidende Rolle spielt. Prominente Beispiele aus der Literatur hierfür sind *Shigella* ssp., *Salmonella* ssp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis* und *Campylobacter jejuni*. Mutationen in den mit PolyP-Synthese assoziierten Genen, insbesondere der PPK1, kompromittieren die Pathogenität dieser Bakterienspezies (Choi et al., 2012; Chuang et al., 2013; Dalebroux et al., 2010; Jahid et al., 2006; Kim et al., 2002; Nikel et al., 2013; Rashid et al., 2000b; Wang et al., 2018). Für einige Pathogene ist eine Einschränkung in der Motilität der Zellen für die entsprechenden ppk1-Mutanten beschrieben worden (Fraleley et al., 2007; Rashid et al., 2000). Motilität ist ein wichtiger Faktor für die Invasion des Wirtssystems und die Etablierung einer Infektion (Rashid et al., 2000). Zhang et al. haben bereits 2002 bioinformatisch eine Gruppe von

Mikroorganismen identifiziert, die weder *ppk1* noch *ppk2* genomisch codieren. Viele dieser Organismen können den Archaea zugeordnet werden, stellen obligat intrazelluläre Pathogene dar oder sind Vektor-basierte Parasiten (Nelson and Stegen, 2015; Wang et al., 2018). Daraus lässt sich die These ableiten, dass die entsprechenden, für PolyP-Metabolismus verantwortlichen Gene im Rahmen der Evolution dieser Spezies, aufgrund der Anpassung an die im Gegensatz zur Umwelt viel stabileren Lebensbedingungen im Wirt, verloren gegangen sind (Henrissat et al., 2002; Moran, 2002).

Während die Bedeutung von PolyP im Rahmen der Blutgerinnung der Säugetiere und des Menschen bereits relativ gut verstanden ist (Smith et al., 2010; Travers et al., 2015), ist das Verständnis um die immunologischen Modulationen und Prozesse, die durch PolyP ausgelöst werden lückenhaft (Morissey & Smith, 2015). Insbesondere das Verständnis der Prozesse im Rahmen einer Entzündungsreaktion, sowohl auf Seite des Pathogens als auch auf Seite des Wirts und die spezifische Interaktion beider Systeme miteinander im Sinne einer Pathogen-Wirts-Interaktion ist bisher wenig erforscht.

Es ist bekannt, dass PolyP mit einer Kettenlänge von 70 Phosphateinheiten (S-PolyP), die Expression des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls-1 (VCAM-1), interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und E-Selectin durch Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs, heraufreguliert (Dinarvand et al., 2014). Dies fördert im Experimentalmodell die Adhäsion monocytischer THP-1 Zellen an PolyP-stimulierte Endothelzellen (Bae et al., 2012). Für die in Endothelzellen beobachteten Effekte wurden zwei Rezeptoren, P2Y1 und RAGE (*Receptor for advanced glycation end products*), beschrieben (Dinarvand et al., 2014). Darüber hinaus wurde eine hoch-affine Bindung von PolyP (S-PolyP und L-PolyP) an Histon H4 und HMGB1 beschrieben. Bei HMGB1 und Histon H4 handelt es sich um nukleäre Proteine, die im Rahmen einer Aktivierung von Immunzellen freigesetzt werden und im Rahmen einer Entzündungsreaktion als späte pro-inflammatorische Cytokine wirken können. Bindung von PolyP an diese Proteine erhöht ihr pro-inflammatorisches Potenzial sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Dinarvand et al., 2014; Holdenrieder et al., 2008; Wang et al., 1999; Xu et al., 2009).

Gerinnung und angeborene Immunität sind zwei eng miteinander vernetzte Systeme (Antoniak, 2018). Das Kontaktsystem der Blutgerinnung wird durch PolyP aktiviert. Dies kann über nachfolgende, klassische Komplementaktivierung die Migration phagozytischer Zellen an den Infektionsort und die adaptive Immunantwort stimulieren. Trotz dieser initialen Komplement-Aktivierung wurde die Beobachtung gemacht, dass PolyP die finale Zelllyse durch Destabilisierung von C5b/C6, Schlüsselkomponenten im Aufbau des MAC (*membrane attack complex*), hemmt (Wat et al., 2014). Darüber hinaus ist PolyP physiologischer Cofaktor der Interaktion zwischen C1-Inhibitor (C1-Inh) und der initiierenden Serin-Protease C1s des klassischen Wegs der Komplementaktivierung. Diese molekulare Interaktion unterdrückt die klassische Komplementaktivierung in Konzentrations- und Kettenlängen-abhängiger Weise (Wijeyewickrema et al., 2016).

2.2.3. Kandidatengene für Polyphosphatrezeptoren in Makrophagen

Durch Bindungsexperimente mit immobilisierten Polyphosphatmolekülen und Identifizierung gebundener Proteine mittels Massenspektrometrie wurde eine Vielzahl Polyphosphat-bindender Proteine identifiziert. Mittels Transkriptomanalyse wurde für einige der codierenden Gene eine differentielle Regulation nach LPS-Stimulation festgestellt.

Die Funktion der hier vorgestellten Proteine, insbesondere in der Entzündungsantwort und Regulation der Polyphosphat-Signalgebung, ist bisher wenig erforscht, weshalb die Genprodukte hinsichtlich ihrer immunologischen Funktion und als Polyphosphat-Rezeptorenkandidaten untersucht werden sollen. Eine aktuelle Literaturrecherche (Anfang

November 2019) offenbart: Drei aktuelle Publikationen für TMEM206 (2019) in PubMed, die TMEM206 im Titel oder in der Zusammenfassung direkt erwähnen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Zwei davon analysieren die Funktion von TMEM206 bei der Vermittlung Säure-induzierten Chlorid-Influges, eine analysiert die Assoziation von TMEM206 mit Darmkrebs. Darüber hinaus sind 26 weitere Publikationen in der PMC-Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>) zu finden, die einen deutlich schwächeren Bezug zu TMEM206 aufweisen und das Gen oder Protein lediglich im Ergebnis oder Diskussionsteil präsentieren.

Für MYADM finden sich aktuell 18 Publikationen, die das Protein im Titel oder der Zusammenfassung erwähnen, in der PubMed-Datenbank. Die erste Beschreibung des Proteins im Zusammenhang mit der myeloiden Differenzierung erfolgte im Jahre 2000 (Pettersson et al., 2000).

TMCO1 ist im Zusammenhang mit Erkrankungen des Cerebrofaciothorakalem Dysplasie (CFTD)-Spektrums und Glaukome bereits recht häufig in der Literatur beschrieben worden. Aktuell finden sich in der PubMed-Datenbank 41 Publikationen, davon sieben, die diesjährig (2019) erschienen sind und TMCO1 im Titel oder in der Artikelzusammenfassung erwähnen.

2.2.3.1 TMEM206

Bei TMEM206 (Transmembranprotein 206) handelt es sich um ein *Multipass* Transmembranprotein der TMEM-Proteinfamilie mit Lokalisation in der Zellmembran und einer Größe von etwa 40 kDa. Die TMEM-Proteinfamilie ist bisher nur sporadisch erforscht, wobei jedoch bereits Einblicke in die vielfältige Funktionalität einzelner Mitglieder erhalten wurden. In der Literatur wurde beispielsweise für TMEM16A eine Funktion als Calcium-aktivierter Chloridkanal beschrieben (Hartzell et al., 2010; Yang et al., 2008). TMEM16F scheint erforderlich für die Exposition von Phosphatidylserin auf aktivierten, murinen Plättchen, das als Bindungsplattform für den Aufbau von Tenase- und Prothrombinase-Komplex dient (Fujii et al., 2015). TMEM132A könnte hingegen eine wichtige Rolle in der embryonalen und postnatalen Gehirnentwicklung spielen (Oh-Hashi et al., 2010). TMEM176B könnte transplantationsimmunologisch eine große Rolle spielen. TMEM176B ist beispielsweise in Allograft-toleranten Mäusen überexprimiert. Darüber hinaus wurde abnormale Akkumulation von TMEM176A und TMEM176B auch mit der Krebspathogenese korreliert (Cuajungco et al., 2012; Zuccolo et al., 2010). TMEM170B hingegen inhibiert Brustkrebswachstum und -metastasierung durch Regulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs (Li et al., 2018). Diese diversen Funktionen einzelner Gruppenmitglieder zeigen einerseits die funktionelle Relevanz andererseits aber auch die Funktionsvielfalt dieser Proteinfamilie auf und zeigen, wie wichtig zukünftige, umfangreichere Untersuchungen und funktionelle Charakterisierungen von TMEM-Proteinen sind.

Das Protein TMEM206 ist in der Maus vor allem in Niere, Lunge und Testis stark exprimiert (Palasca et al., 2018; Gregg et al., 2010; Huttlin et al., 2010), im Menschen wurde auch eine deutliche Expression im zentralen Nervensystem (ZNS) beschrieben (Uhlen et al., 2015). N- und C-Terminus des Proteins sind cytosolisch lokalisiert (Ullrich et al., 2019), wobei der N-Terminus insgesamt vier durch Phosphorylierung modifizierbare Aminosäurereste enthält. An Position 9, 14 und 24 der Aminosäuresequenz finden sich Serine, die Position 10 ist durch einen Tyrosinrest okkupiert (Abb. 3). Die extrazelluläre Domäne kann an den Asparaginresten 155 und 162 N-Glykosyliert werden (UniProt Consortium, 2008).

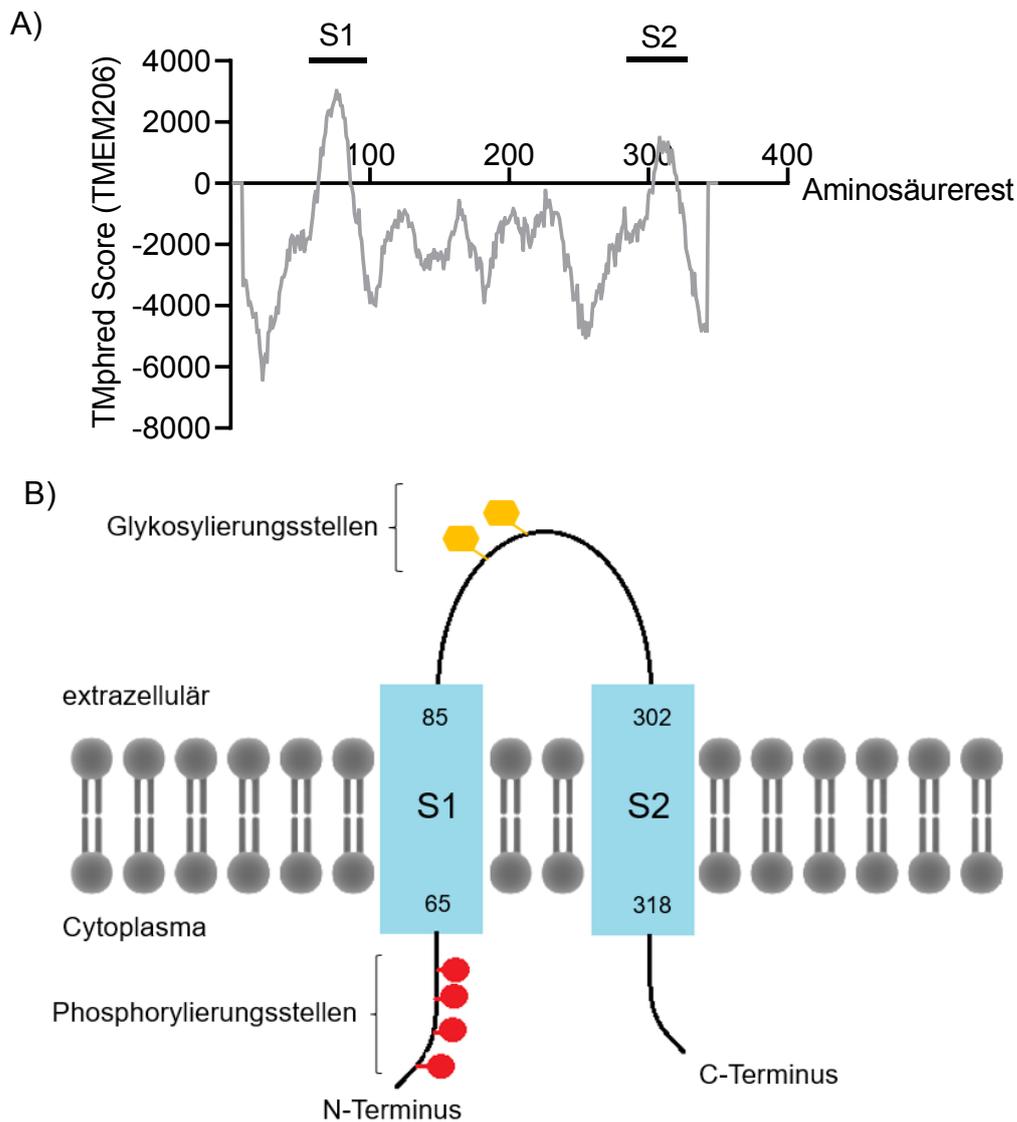


Abb. 3: Vorhergesagte Membrantopologie für murines TMEM206 und Modelldarstellung. A) Vorhersage der zwei helikalen Transmembrandomänen (S1 und S2) durch TMphred (Hofmann & Stoffel, 1993). B) Modell der Membrantopologie. Das 350 Aminosäuren große Protein besitzt zwei Transmembransegmente (S), sowie einen cytoplasmatisch lokalisierten N- und C-Terminus. Mehrere Phosphorylierungsstellen am N-Terminus, sowie zwei Glykosylierungsstellen wurden innerhalb der extrazellulären Sequenz vorhergesagt (Adaptiert nach Daten von UniProt Consortium, 2008; Ullrich et al., 2019).

Die Funktion von TMEM206, insbesondere im immunologischen Kontext, ist weitgehend unbekannt. Zhao et al. haben 2018 eine Verbindung zwischen TMEM206-Expression und Proliferation und Malignität colorectaler Krebszellen hergestellt. Dabei wurde eine starke Expression von TMEM206 in colorectalen Krebszellen gezeigt, während die Expression in nicht-entarteten Zellen der enterischen Mukosa eher gering ist (Zhao et al., 2019; Chen et al., 2019). Hierbei zeigte sich nach Hochregulation von TMEM206 eine Verstärkte Akkumulation von phospho-Akt und weiteren nachgeschalteten Signalmolekülen der Zellproliferation, phospho-Glykogensynthase-Kinase und Cyclin D1. Die Hochregulation von TMEM206 wurde mit verstärkter Zellmigration und Invasion von Tumorzellen assoziiert, während RNA-vermitteltes *Gene silencing* zur einer Arretierung des Zellzyklus' in der G0/G1-Phase führte (Zhao et al, 2019).

Mittels Co-Immunopräzipitation wurde eine Interaktion zwischen TMEM206 und Akt nachgewiesen. TMEM206-Überexpression führt neben Akt-Phosphorylierung (Ser473)

auch zu ERK-Phosphorylierung (p44/p42), ohne Einfluss auf die jeweilige Gesamtproteinmenge. Eine direkte Interaktion zwischen TMEM206 und ERK konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Zhao et al., 2018). Zusätzlich zur Assoziation von TMEM206 mit CRC wurden die Transkripte als prognostischer Marker für die biochemische Rezidivrate (*biochemical recurrence*, BCR) von Prostatakarzinomen nach Prostatektomie (Johnston et al., 2019; Tourinho-Barbosa et al., 2018)

Kürzlich wurde TMEM206 in zwei unabhängigen Publikationen nahezu zeitgleich als Bestandteil Protonen-aktivierter Chloridkanäle (ASOR-Kanäle, *acid-sensitive outwardly rectifying*) beschrieben (Ullrich et al., 2019; Yang et al., 2019). Diese Kanäle vermitteln unter aziden Extrazellulärbedingungen den Einfluss von Chlorid-Ionen in die Zellen. Bei 37 °C werden sie ab einem pH-Wert von etwa pH6,0 aktiviert, der beispielsweise im Rahmen eines ischämischen Schlaganfalls im nicht mehr zirkulatorisch versorgten Gewebe, gefunden werden kann (Sato-Numata et al., 2013; Yang et al., 2019). Gewebsazidose wird einer der zugrundeliegenden Mechanismen für neuronalen Zelltod und Entstehung von Hirnschädigungen angesehen. Durch Vermittlung von Cl⁻-Influx durch aktivierte Chloridkanäle kommt es zum osmotischen Anschwellen der Zellen mit anschließendem Zelltod (Wang et al., 2007; Yang et al., 2019). Knock-out von TMEM206 im murinen Modell verhinderte Protonen-aktivierten Chlorid-Influx und milderte den Umfang eintretender Hirnschäden im Rahmen eines ischämischen Schlaganfalls (Yang et al., 2019). Da die Aktivierungsschwelle der ASOR-Kanäle zu azide ist, um unter gewöhnlichen physiologischen Bedingungen aufzutreten, könnte eine Funktion im endozytotischen Weg und sekretorischen Vesikeln naheliegen (Ullrich et al., 2019; Yang et al., 2019). Diese Vesikel weisen regulär einen luminalen pH-Bereich von pH4,5 – pH 6,5 auf. Es wurde postuliert, dass ASOR zwischen Plasmamembran und intrazellulären Organellen zirkulieren könnte und so ihre Funktion durch Steuerung der luminalen Chlorid-Konzentration modulieren könnte (Steinberg et al., 2013; Stauber et al., 2013; Mindell et al., 2012; Yang et al., 2019). Auch denkbar wäre eine Rolle bei der luminalen Azidifizierung durch Erleichterung von Strömen der Proton-ATPase, wie sie bereits für endosomale CIC (*chloride channel*) Chloridtransporter beschrieben wurde (Günther et al., 1998; Jentsch, 2007; Piwon et al., 2000; Ullrich et al., 2019). Eine weitere immunologische Funktion von TMEM206 könnte bei der Antwort auf eine chronische Virusinfektion bestehen. Transkriptomanalysen haben gezeigt, dass TMEM206 als differentiell reguliertes Gen im Rahmen einer chronischen Hepatitis C-Virusinfektion heraufreguliert ist (Papic et al., 2012).

2.2.3.2 MYADM

Zell-Migration ist ein wichtiger Faktor in der Immunantwort auf in den Körper eindringende Pathogene. Die Rekrutierung von Zelltypen der angeborenen Immunantwort, wie Makrophagen und Neutrophilen an den Ort einer Infektion beruht auf deren Motilität. Dabei lässt sich Zellmigration als ein cyclischer Prozess von Auf- und Abbau Integrin-basierter Adhäsionsstrukturen verstehen, die durch das darunterliegende Cytoskelett koordiniert werden (Aranda et al., 2011; Ridley et al., 2003). Auch für Embryonalentwicklung und Wundheilung sind Zellmotilitätsprozesse von entscheidender Bedeutung. Zur Generierung gerichteter Zellmotilität ist der Aufbau einer Membranasymmetrie vonnöten, mit der auch eine Asymmetrie in der durch einen Bewegungsreiz induzierten zellulären Signalgebung erreicht werden kann (Aranda et al., 2011; Mañes et al., 2003). Grundlage dieser Asymmetrie ist eine intrinsische Membranheterogenität, die den selektiven, räumlich und zeitlich begrenzten Aufbau von Signalkomplexen ermöglicht (Golub & Pico, 2005). Ein Modell zur Beschreibung zellulärer Membranheterogenität wird durch das *lipid raft*-Modell dargeboten. Bei diesen *rafts* handelt es sich um geordnete Membranstrukturen mit hohem Anteil an Glykolipiden und Cholesterin, die auch bei der Rekrutierung von Proteinen für den

Membrantransport und beispielsweise Caveolae-Bildung von Bedeutung sind (Simons & Ikonen, 1997; Lingwood & Simons, 2010).

Mitglieder der MAL-Proteinfamilie wurden in Membranrafts nachgewiesen und funktionell bereits in der Literatur beschrieben. Die am besten erforschten Proteine Plasmolipin, MAL und MAL2 weisen dabei jeweils vier Transmembransegmente auf. MYADM wurde als weiteres Mitglied der MAL-Familie identifiziert und unterscheidet sich durch acht Transmembransegmente deutlich von den zuvor beschriebenen Mitgliedern dieser Proteinfamilie. Ein charakteristisches Merkmal der MAL-Proteinfamilie ist die MARVEL (*MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link*)-Membrandomäne, mit vier Transmembransegmenten, die in 28 humanen Proteinen aus drei Proteinfamilien identifiziert wurde, darunter die MAL-Familie (Aranda et al. 2011; Sánchez-Pulido et al., 2002).

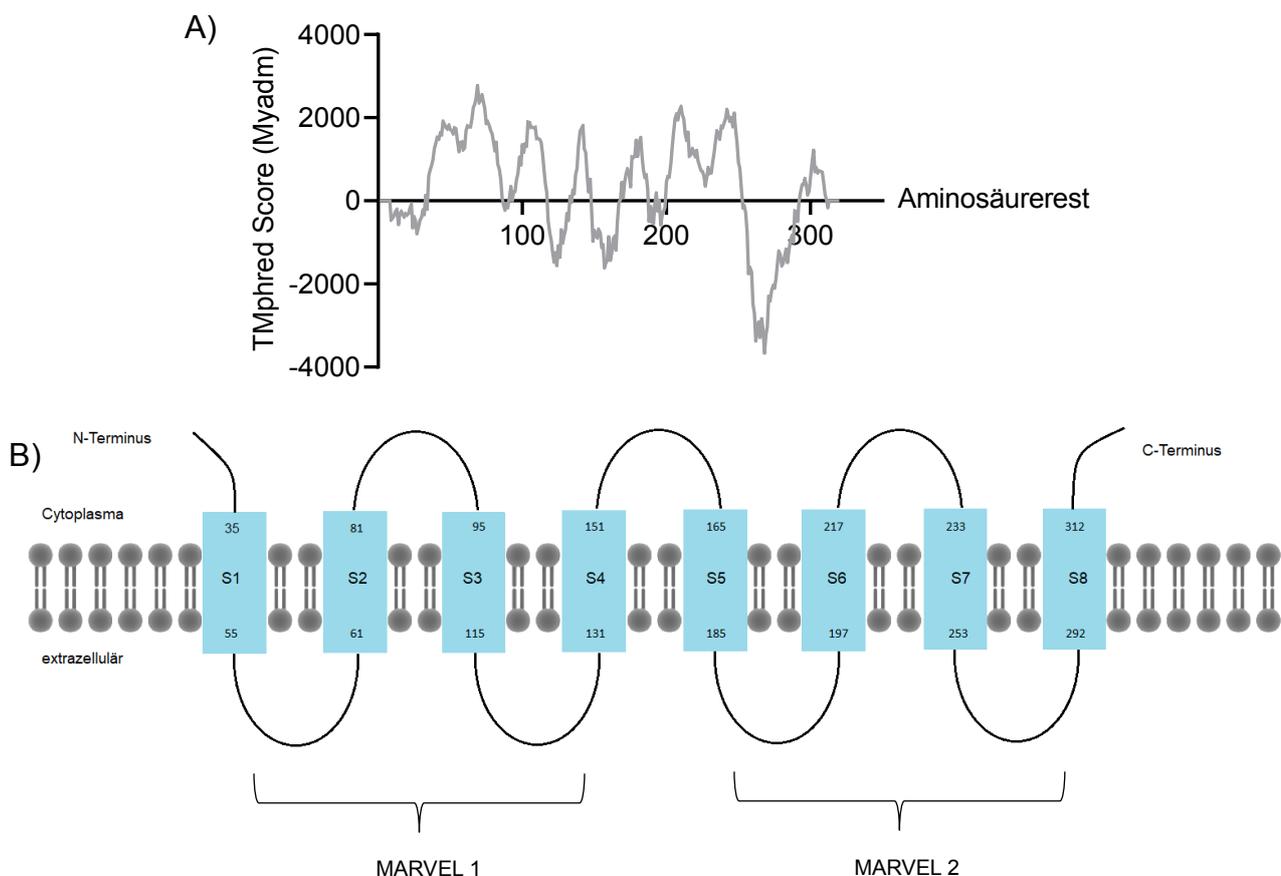


Abb. 4: Vorhergesagte Transmembransegmente sowie theoretisches Modell der MYADM-Topologie. A) Vorhersage der acht helikalen Transmembrandomänen (S1 – S8) durch TMphred (Hofmann & Stoffel, 1993). B) Modell der Membrantopologie. Das 320 Aminosäuren große, murine Protein besitzt acht Transmembransegmente (S), sowie einen cytoplasmatisch lokalisierten N- und C-Terminus. (Adaptiert nach Daten von UniProt Consortium, 2008; Modell erstellt nach: Krogh et al., 2001; Tsirigos et al., 2015).

Zellulär ist MYADM im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der MAL-Familie und MYADM-like-Proteinen (MYADML1 und MYADML2), die intrazellulär verteilt vorliegen, in der Cytoplasmamembran lokalisiert, wo es mit F-Actin in *membrane ruffles/Lamellipodien* colokalisiert (Aranda et al., 2011). MYADM besitzt zwei MARVEL-Domänen, die für das Membran-targeting des Proteins verantwortlich sind. Durch Knock-down-Experimente wurde *in vitro* bestätigt, dass MYADM ein wichtiger Faktor für die Zellmigration darstellt und Membrankondensation reguliert. Die Geschwindigkeit zellulärer Migration von MYADM-

Knock-down Zellen ist im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant reduziert (Aranda et al., 2011).

Endogenes humanes MYADM ist, wie alle derzeit bekannten MAL-Familienmitglieder, vor allem in den hochgeordneten DRMs (*detergent resistant membranes*) lokalisiert (Brown & Rose, 1992; Aranda et al., 2011). Rac1, eine kleine GTPase, die eine besondere Rolle in der Reorganisation des Cytoskeletts spielt, lokalisiert bevorzugt in hochgeordnete Membranbereiche. Experimentell wurde eine Colokalisation von Rac1 in MYADM-angereicherte hoch-geordnete DRMs gefunden. Für MYADM wurde daher eine Rolle als Organisator von Plasmamembranmikrodomänen und Rac1-targeting in diese geordneten Membranstrukturen postuliert (Aranda et al., 2011).

MYADM-Expression ist während der Zellmigrationsprozesse im Rahmen von Hämatopoese und Melanommetastase stark reguliert (Pettersson et al., 2000; de Wit et al., 2005). Eine verringerte MYADM-Transkription wurde in Melanommetastasen im Vergleich mit benignen Zellen nachgewiesen (de Wit et al., 2005). Dieser Befund erscheint konträr zu der beschriebenen Rolle von MYADM in der Rac1-abhängigen, zellulären Migration (Aranda et al., 2011). Neben dem Rac1-abhängigen Migrationsprozess wurde jedoch in Melanomzellen auch eine Rho-abhängige, amöboide Migration beschrieben (Sanz-Moreno et al., 2008 & 2010). Die beiden Modelle, Rac1-abhängiger und Rho-abhängiger, zellulärer Migration sind dabei interkonvertierbar. Die amöboide, Rho-abhängige Migration, könnte durch niedrige Rac-Aktivität wie unter Bedingungen von MYADM-Knock-down, gefördert werden (Aranda et al., 2011; Sanz-Moreno et al., 2010).

Im Gegensatz zur Melanommetastasierung ist MYADM-Genexpression während der myeloiden Differenzierung heraufreguliert (Pettersson et al., 2000). MYADM wird ubiquitär exprimiert und ist auch in Endothelzellen für die Organisation von *membrane rafts* der epithelialen Zelloberfläche verantwortlich (Aranda et al., 2013). Ein immunologisch bedeutsamer Befund ist dabei, dass MYADM-Knock-down durch Induktion von ICAM-1 Expression einen pseudoinflammatorischen Phenotyp in Endothelzellen auslöst (Aranda et al., 2013). MYADM-*Silencing* führt zu einer Störung der Zell-Zell-Interaktion via Zell-Zell-Verbindungen durch β -Catenin, VE-Cadherin und PECAM-1 und erhöht die Zellpermeabilität sowie die Menge filamentösen Aktins (F-Aktin). *In vitro* wurde in diesem Zusammenhang die Bildung interzellulärer Lücken in endothelialen Monolayern gefunden (Arranda et al., 2013). Diese Befunde weisen darauf hin, dass MYADM-Knock-Down zu endothelialer Dysfunktion führt, eine Beobachtung, die auch während eines septischen Krankheitsgeschehens ein Problem darstellt. Allgemein sind erhöhte Aktinpolymerisation und Permeabilität prototypische endotheliale Antworten auf inflammatorische Reize (Pober & Sessa, 2007). MYADM-Depletion induziert zwar erhöhte ICAM-1-Expression, ist aber weder räumlich noch funktionell mit ICAM-1 assoziiert. MYADM-Silencing führt darüber hinaus zu einer zwei- bis dreifach verstärkten Phosphorylierung von ERM (Ezrin, Radixin, Moesin)-Proteinen, die eine molekulare Brücke zwischen Plasmamembran und Cytoskelett bilden. Aktivierung von ERM-Proteinen durch Phosphorylierung erhöht ebenfalls die Permeabilität vaskulärer Endothelzellen während einer Entzündungsantwort (Koss et al., 2006).

2.2.3.3. TMCO1

TMCO1 (*Transmembrane and coiled-coil domain 1*) ist ein evolutionär hoch konserviertes ER-Transmembranprotein mit physiologischer Funktion in der zellulären Calcium-Homöostase (Wang et al., 2016). Die Aufrechterhaltung zellulärer Ca^{2+} -Hämostase ist insbesondere von Bedeutung für Calcium-abhängige Signalprozesse und die Funktion metabolischer Prozesse. CRAC (*Ca²⁺-release activated channel*)-Kanäle sind für Ca^{2+} -Influx und Rekonstitution des zellulären Ca^{2+} -Speichers nach Entleerung verantwortlich. Um

ein Überschießen der zellulären Ca^{2+} -Konzentration zu verhindern, müssen gegensteuernde Mechanismen existieren. In der Literatur wurde eine Reihe von passiven Kanälen wie Presenelinen oder Ryanodinrezeptoren beschrieben, die einen stetigen Ca^{2+} -Efflux ermöglichen könnten. Im Gegensatz zu diesen passiven Kanälen beschreiben Wang et al., TMCO1 als einen aktiven Ca^{2+} -Kanal, der in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration tetramerisiert und bei überschießender Calcium-Ionenkonzentration im ER durch Calcium-Efflux physiologische Bedingungen wiederherstellt (Wang et al., 2016). TMCO1 zeigt eine hochkonservierte Aminosäuresequenz zwischen einzelnen Arten und Komplementation der humanen TMCO1-Genfunktion durch Expression von *C. elegans* oder Zebrafisch TMCO1 ist möglich, was einen evolutionär konservierten Funktionsmechanismus dieses Proteins nahelegt. Aufgrund seiner Funktion in der Aufrechterhaltung physiologischer ER-Calciumkonzentrationen bezeichnen Wang et al. TMCO1 als CLAC (*Ca²⁺ load activated channel*) (Wang et al., 2016).

TMCO1-Defekte wurden als genetische Grundlage des autosomal rezessiv vererbten und zunächst in Amish aus dem nordöstlichen Ohio beschriebenen, humanen Cerebrofaciothorakalem Dysplasie (CFTD) Spektrum (CDS), gefunden. Dieses Syndrom ist unter anderem charakterisiert durch craniofaciale Dysmorphie, Skelettanomalien, Ganginstabilität und mentale Retardation (Alanay et al., 2014; Xin et al., 2010).

Für TMCO1-Knock-out-Mäuse wurde in der Literatur gleichermaßen ein Phänotyp beschrieben. Dieser umfasst ein reduziertes Körpergewicht, eine verringerte Überlebensrate, verzögerte Osteogenese sowie craniofacialen Dysmorphismus von homozygoten KO-Tieren (Wang et al., 2016). Eine Rolle von TMCO1 in der Osteogenese wurde kürzlich durch Li et al. beschrieben. Hierbei konnte gezeigt werden, dass TMCO1-Defizienz die Knochenbildung *in vivo* inhibitiert. Die Osteoblastogenese wird durch TMCO1 über Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2) reguliert. Dabei stabilisiert TMCO1 den Transkriptionsfaktor durch Regulation seines Acetylierungsstatus (Li et al., 2019).

Der TMCO1-KO-Stamm ist als subviabel und subfertil einzustufen. Wang et al. haben für KO-Tiere eine Geburtsrate von 8,9 % erhalten, was in etwa einem Drittel der theoretisch zu erwartenden 25% homozygoten Tiere aus heterozygoter Verpaarung entspricht. Signifikant vergrößerte Hirnventrikel legen darüber hinaus mentale Retardation der Tiere nahe. Daher erscheinen TMCO1-KO-Mäuse als gutes Modell für das Studium des CDS (Wang et al., 2016). Sun et al. haben 2018 bereits die mechanistische Grundlage für diese in TMCO1-KO-Mäusen beobachtete Subfertilität beschrieben. TMCO1 ist essentiell für die Follikelentwicklung im Eierstock. TMCO1-KO-Tiere zeigen eine aberrante Ca^{2+} -Signalgebung in Granulosazellen in Kombination mit erhöhter ER-Stress-assoziiierter Apoptose und erhöhter intrazellulärer ROS-Konzentration. In der Folge wird eine mit der Alterung der Tiere bis zur 16 Woche drastisch abnehmende Follikelzahl beobachtet. Der beobachtete Phänotyp gleicht dabei dem der prämaternen Ovarinsuffizienz (POI) beim Menschen (Sun et al., 2018).

2.3 Arbeitshypothesen

Inorganische Polyphosphate zeigen kettenlängenabhängig unterschiedliche physiologische Effekte. Kurzkettige Polyphosphate (S-PolyP) wurden in Thrombozyten gefunden und sind wichtige Mediatoren der Blutgerinnung. Langkettige, mikrobielle Polyphosphate (L-PolyP) wurden bereits als wichtige Pathogenitätsfaktoren humanpathogener Mikroorganismen identifiziert. Publierte Arbeiten und Vorarbeiten unserer Gruppe haben zudem gezeigt, dass L-PolyP immunmodulatorische Effekte aufweist und beispielsweise die iNOS-Induktion in Makrophagen hemmt und Makrophagen in Richtung eines anti-inflammatorischen Phänotyps polarisiert. Ziel dieser Arbeit war es, die Hypothese zu testen, dass L-PolyP unter Bedingungen der Sepsis zur einer Herabsetzung der angeboren Immunreaktion und damit einer verschlechterten Elimination der eindringenden Mikroorganismen führt. Dies führt in der Folge zu einer gravierenden systemischen Immunreaktion, die über Multi-Organversagen zum Tod führt. In diesem Zusammenhang sollte der therapeutische Effekt eines L-PolyP-Verdau, insbesondere auf das Überleben nach Sepsisinduktion, im Mausmodell getestet werden. Gemäß unserer Hypothese sollte die enzymatische Degradation von L-PolyP zu einer verringerten Mortalität führen.

Für die in vitro in Makrophagen beobachteten L-PolyP-Effekte insbesondere auf die Zytokinproduktion und Induktion von iNOS sind bisher keine Rezeptoren identifiziert worden. Die für Endothelzellen beschriebenen PolyP-Rezeptoren RAGE und P2Y1 konnten von unserer Gruppe in Makrophagen nicht verifiziert werden. Für die in Makrophagen beobachteten Effekte wurden durch Massenspektrometrie und Transkriptomanalyse drei Rezeptorkandidaten – TMEM206, MYADM und TMCO1 – identifiziert. In der vorliegenden Arbeit soll demnach die Hypothese untersucht werden, dass diese drei Transmembranproteine für die Vermittlung der immunologischen PolyP-Effekte auf zellulärer Ebene verantwortlich sind.

3 Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Laborbedarf

Experimentell verwendete Laborbedarfsartikel wurden in Tab. 1 aufgelistet.

Tab. 1: Verwendete Laborbedarfsartikel.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Anzuchtröhrchen, 14 ml	Greiner Bio-One
ELISA-Platten NUNC Maxisorp, 96-well	Sigma Aldrich
Filterspitzen (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	StarLab
Flaschenaufsatzfilter (0,22 µm, 45 mm, Celluloseacetat)	Corning
Impfösen	VWR
Kanülen (20 G, 21 G, 23 G, 26 G, 30 G)	Becton Dickinson
Mehrkanalpipette (10 - 300 µl)	StarLab
Mikrotestplatte, schwarz, 96 well	Thermo Fisher Scientific
Mikrotestplatte, V-Boden, 96 well	Corning
Mikrovette CB300K2E	Sarstedt
Mikrovette CB300LH	Sarstedt
Multiply [®] -µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt
Nähseide, steril	SMI
Neubauer (<i>improved</i>) Zählkammer	Brand
PCR-Platte 96-well	Bio-Rad
PCR-Streifen (8 x 250 µl mit Einzeldeckel)	Sarstedt
PD-10 Säulen	GE Healthcare
Petrischalen (10 cm)	Sarstedt
Perma-Hand Nähseide (6.0)	Ethicon
Pipettierreservoirs (25 ml, RNase und DNase-frei)	StarLab
PVDF-Membran	Rocke
Reaktionsgefäße (1,5 mL und 2 ml, RNase und DNase-frei)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One
Spritzen (1 ml, 10 ml, 20 ml)	Becton Dickinson
Whatman Spritzenvorsatzfilter (0,22 µm, Celluloseacetatmembran)	GE
Whatman Filterpapier	GE
Zellheber, 18 cm	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturflasche 182,5 cm ²	VWR

Fortsetzung Tab. 1:

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Zellkulturflasche 75 cm ²	Greiner Bio-One
Zellkulturplatte, 24-well, Zellkulturbeschichtung	Corning
Zellkulturplatte, 24-well, zellabweisend beschichtet	Greiner Bio-One
Zellkulturplatte, 96-well, zellabweisend beschichtet	Greiner Bio-One
Zellsieb (100 µm)	Thermo Fisher Scientific

3.1.2. Puffer und Medien

Die im Rahmen der Experimente verwendeten Puffer, Lösungen und Medien wurden in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Verwendete Puffer und Medien.

<u>Puffer/Medium</u>	<u>Zusammensetzung/Hersteller</u>
Azidmedium (pH5,5)	25 mM HEPEPS (pH5,5); 2 g/l Glukose; 6,4 g/l NaCl; 0,4 g/l KCl; 0,14 g/l CaCl ₂ ; 0,1 g/l MgSO ₄ ; 10 % (v/v) FBS
BD Cytotfix	BD Bioscience
BD Cytotfix/Cytoperm	BD Bioscience
BMDM Medium (L929 <i>conditioned medium</i>)	49 % (v/v) RPMI 1640, 30% (v/v) L929 Zellkulturüberstand, 20% (v/v) FCS, 1% (v/v) P/S
Biopsie-Lysepuffer	25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA, pH12
Biopsie-Neutralisationspuffer	40 mM Tris-HCl, pH5
Bio-Plex <i>sheath fluid</i>	BD Bioscience
Columbia Blut-Agar-Platten	BD Bioscience
ELISA Reagenzdiluent (IL-27)	PBS mit 1 % (w/v) BSA Fraktion V
ELISA Reagenzdiluent (PF4)	20 mM Tris Base, 150 mM NaCl, 0,1% (w/v) BSA Fraktion V, 0,05 % (v/v) Tween [®] 20
ELISA Waschpuffer	PBS mit 0,05 % (v/v) Tween [®] 20
FACS Puffer	0,25 % (w/v) BSA, 0,02% (w/v) Natriumazid, 2 mM EDTA in PBS
HBSS	Gibco
Lämmli-Probenpuffer (5x)	10 % (w/v) SDS, 10 mM DTT, 20 % (v/v) Glycerol, 200 mM Tris-HCl, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
LB (Luria/Miller) Medium	1 % (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,0; Carl Roth
L929 („L-Zell“) Medium	RPMI 1640, 10 % (v/v) FCS, 1% (v/v) P/S
Makrophagenmedium	RPMI 1640, 0,1 % (w/v) BSA, 1 % (v/v) P/S
Neutralmedium (pH7,2)	25 mM HEPEPS (pH7,2); 2 g/l Glukose; 6,4 g/l NaCl; 0,4 g/l KCl; 0,14 g/l CaCl ₂ ; 0,1 g/l MgSO ₄ ; 10 % (v/v) FBS
PBS (10x)	Thermo Fisher Scientific

Fortsetzung Tab. 2:

<u>Puffer/Medium</u>	<u>Zusammensetzung/Hersteller</u>
PBS (1x, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Gibco
PBS · EDTA	PBS (1x), 0.5 mM EDTA
PPX Bindungspuffer	50 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, 50 mM Imidazol, pH 7,5
PPX Dialysepuffer	20mM Tris HCl (pH=7,5), 50mM KCl
PPX Elutionspuffer	50 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,5
PPX Puffer	20 mM Tris-HCl, pH7,5; 50 mM KCl
PPX Reaktionspuffer	50 nM HEPES (pH8,0), 175 nM KCl, 1mM MgCl ₂
RIPA Lysepuffer (10x)	Merck Millipore
Rotiphorese® SDS-PAGE Elektrophorese Puffer	Carl Roth
TAE Puffer	AppliChem
TBS	100 mM Tris, 154 mM NaCl in ddH ₂ O, pH 7,5
TBST	TBS, 0,1 % (v/v) Tween®20
Western Blot Transferpuffer	20 % (v/v) Methanol, 25 mM Tris, 192 mM Glycin

3.1.3. Reagenzien und Chemikalien

Für die Herstellung von Lösungen und sonstige, experimentell genutzte Chemikalien wurden in Tab. 3 zusammengestellt.

Tab. 3: Verwendete Reagenzien und Chemikalien.

<u>Reagenz</u>	<u>Hersteller</u>
123count eBeads™	Thermo Fisher Scientific
Acrylamid Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth
Agar-Agar	Carl Roth
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	AppliChem
Benzonase®	Merck Millipore
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer
BioSafe Coomassie G250	Bio-Rad
Bovines Serum-Albumin, 35 % (w/v) in DPBS	Carl Roth
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (CaCl ₂), Dihydrat	Carl Roth
cComplete Protease Inhibitor, Tabletten	Roche
Desderman®	Schülke & Mayr
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich

Fortsetzung Tab. 3:

Reagenz

Destilliertes Wasser, RNase- und DNase-frei
DL-Dithiothreitol (DTT)
Desoxyribonuklease I (aus Rinderpankreas)
ECL-Reagenz
EDTA-Lösung (0.5 M, steril)
Essigsäure, 100 %
Ethanol, absolut
Fetales Kälberserum (FKS)
Fixable Viability Dye eFluor780, eFluor450
Formaldehyd 37%(v/v)
Glukose, wasserfrei
Glycerol
Glycin
HEPES (pH5,5), 1 M
HEPES (pH7,2), 1 M
Imidazol
Isofluran
Isopropanol
Kaliumchlorid (KCl)
Ketamin (50 mg/ml)
Kollagenase D (aus *Clostridium histolyticum*)
Lysozym (aus Hühnereiweiß)
Magnesiumsulfat
Magermilchpulver
Methanol (*blotting grade*), >99,9 %
Natriumazid
Natriumchlorid
Natriumhydroxid
Natriumnitrat
Natriumphosphat
One comp eBeads
pHrodo Green *E. coli*
Penicillin-Streptomycin (P/S),
10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin
Ponceau S

Hersteller

Gibco
Sigma-Aldrich
Sigma
Cell Signaling Technology
Promega
Carl Roth
Carl Roth
Sigma-Aldrich
Thermo Fisher Scientific
AppliChem
Carl Roth
Carl Roth
AppliChem
United States Biological
Gibco
AppliChem
Abbott
Carl Roth
Sigma Aldrich
Hameln
Sigma Aldrich
Sigma Aldrich
Carl Roth
AppliChem
Carl Roth
Sigma-Aldrich
Carl Roth
Merck
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
Thermo Fisher Scientific
Thermo Fisher Scientific
Thermo Fisher Scientific
AppliChem

Fortsetzung Tab. 3:

<u>Reagenz</u>	<u>Hersteller</u>
Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™	Bio-Rad
RNase AWAY™	Molecular Bioproducts
Rompun®	Bayer
Roti-Stock SDS (20 % w/v)	Carl Roth
Salzsäure (HCl), 25 %	Carl Roth
Terralin®	Schülke & Mayr
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth
TRIS Base	AppliChem
Tris-hydrochlorid	AppliChem
Trypan Blau (0,4 % w/v)	Sigma-Aldrich
Tween® 20	Sigma Aldrich

3.1.4. Molekularbiologische Kits

Die im experimentellen Kontext vielfach genutzten Kits wurden in Tab. 4 aufgelistet.

Tab. 4: Verwendete Kits. Experimentell verwendete Kits sowie jeweilige Bezugsquelle.

<u>Kit</u>	<u>Hersteller</u>
BIOMOL® Green	Enzo Life Sciences
cDNA Reverse Transcription Kit „High Capacity“	Applied Biosystems
Griess Reagent Kit	Thermo Fisher Scientific
DreamTaq Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific
innuPREP RNA mini Kit	Analytik Jena
Maus CCL2/MCP1 ELISA	R&D Systems
Maus CXCL10/IP-10 ELISA	R&D Systems
Maus CXCL4/PF4 ELISA	R&D Systems
Maus IL-27 ELISA	R&D Systems
Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns (0,5 ml)	Thermo Fisher Scientific
QIAQuick Gel Extraction Kit	QIAGEN
ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Kit	GenScript

3.1.5. Agonisten und Inhibitoren

Die im Rahmen von in vitro und in vivo-Experimenten genutzten Agonisten und Inhibitoren sind in der Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Verwendete Stimulantien und Arbeitskonzentrationen.

<u>Substanz</u>	<u>Arbeitskonzentration</u>	<u>Hersteller</u>
Dimethylitaconat	100 µM	Sigma-Aldrich
IL-4	10 ng/ml	PeptoTech
IL-6	20 ng/ml	PeptoTech
L-PolyP (700mer)	50 µM P _i	Kerafast
LPS (<i>E. coli</i> 0111:B4)	100 ng/ml	Sigma-Aldrich
LTA	10 µg/ml	Sigma-Aldrich
Mannan (<i>S. cerevisiae</i>)	10 µg/ml	Sigma-Aldrich
murines IFN-β, rekombinant	500 U/ml	PBL Assay Science
murines IFN-γ, rekombinant	50 U/ml	PeptoTech
Peptidoglykan (<i>Bacillus subtilis</i>)	250 ng/ml	Sigma-Aldrich
S-PolyP (25-125mer)	50 µM P _i	Prof. J. Morrissey, Champaign, IL, USA sowie Kerafast
Zymosan A (<i>S. cerevisiae</i>)	50 µg/ml	Sigma-Aldrich

3.1.6. Zelllinien und Bakterienstämme

Für die Produktion des L929-Überstandes wurde die in Tab. 6 aufgeführte Zelllinie genutzt.

Tab. 6: Verwendete Zelllinien.

<u>Zelllinie</u>	<u>ATCC® Identifizierungsnummer</u>
L929 Fibroblasten	CCL-1

Die Herstellung rekombinanter ScPPX erfolgte durch den in Tab. 7 gelisteten Bakterienstamm.

Tab. 7: Verwendete Bakterienstämme.

<u>Bakterienstamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Quelle</u>
<i>E. coli</i> MJG317	PPX-überexprimierend	Jakob, U. (Lempart et al., 2019)

3.1.7. Antikörper

3.1.7.1 FACS-Antikörper

Die für FACS-Färbungen genutzten Antikörper wurden in Tab. 8 aufgelistet.

Tab. 8: Verwendete FACS-Antikörper.

AF488: Alexa Fluor™ 488, AmCyan: *Anemonia majano* Cyan-fluoreszierendes Protein; APC: Allophycocyanin, BV510: Brilliant Violet™ 510, Cy5.5: Cyanin 5.5, Cy7: Cyanin 7, FITC: Fluoresceinisothiocyanat, PB: Pacific Blue™, PE: Phycoerythrin, PerCP: Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex

<u>Antigen/Isotyp</u>	<u>Klon</u>	<u>Konjugat</u>	<u>Hersteller</u>
CD3	145_2C11	PB	BioLegend
CD4	RM4-5	FITC, BV510	BioLegend
CD8β	53-5.8	PE	BioLegend
CD11b	M1/70	PB	BioLegend
CD11c	N418	AF488	BioLegend
CD19	6D5	PerCP/Cy5.5	BioLegend
CD40	3/23	PE/Cy7	BioLegend
CD40L	MR1	PerCP/Cy5.5	BioLegend
CD45R/B220	RA3-6B2	V500	BD
CD80	16-10A1	PE	BioLegend
CD86	GL-1	APC	BioLegend
CD86	GL-1	FITC	BioLegend
F4/80	BM8	APC	BioLegend
F4/80	BM8	PB	BioLegend
F4/80	BM8	PE	BioLegend
H2Dk	15-5-5	PE	BioLegend
Hamster IgG	16-10A1/HTK888	APC, PB, PE	BioLegend
I-A/I-E	M5/114.15.2	PerCP	BioLegend
iNOS (NOS2)	CXNFT	APC	BioLegend
Ly6C	HK1.4	AmCyan	BioLegend
Ly6G	1A8	PE/Cy7	BioLegend
NK1.1	PK136	APC	BioLegend
NKp46	29A1.4	PE	BioLegend
Rat IgG2a, κ	eBM2a	APC, FITC, PE, PB	BioLegend
Hamster IgG	HTK888	PE, PerCP/Cy5.5	BioLegend
Siglec-F	ES222-10D8	APC	Miltenyi Biotech
pSTAT1 (Y701)	4a	PE	BD
pSTAT3 (Y705)	4/P-STAT3	AF488	BD
pSTAT6 (Y641)	CHI2S4N	PE	invitrogen
TCRβ-Kette	H57-597	BV510	BioLegend
TruStain fcX (anti-CD16/CD32)	93	-	BioLegend

3.1.7.2. Western Blot Antikörper

Die zur Detektion von Proteinbanden im Rahmen des Western Blot genutzten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: Für den Western Blot verwendete Primär- und Sekundärantikörper.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-C1orf75 (TMEM206) – N-Terminus Antikörper	Avia Systems Biology
Mensch und Makake Anti-Myadm Antikörper	enQuire BioReagents
Anti- Ratte/Kaninchen Sekundärantikörper	abcam

3.1.8. qPCR-Primer

Die für die quantitative *real-time* PCR genutzten Primer sind in Tab. 10 zusammengefasst.

Tab. 10: Primer für die quantitative *Real-time* PCR. Die Primersequenzen entstammen Vorschlägen aus dem qPrimer Depot (Cui et al., 2007).

<u>Zielgen</u>	<u>Sequenz (5'- 3')</u>	<u>Referenz</u>
CD80, f	GGCAAGGCAGCAATACCTTA	qPrimer Depot
CD80, r	CTCTTTGTGCTGCTGATTTCG	qPrimer Depot
CD86, f	TCTCCACGGAAACAGCATCT	qPrimer Depot
CD86, r	CTTACGGAAGCACCCATGAT	qPrimer Depot
GAPDH, f	TACCCCAATGTGTCCGTCGTG	qPrimer Depot
GAPDH, r	CCTTCAGTGGGCCCTCAGATGC	qPrimer Depot
IL1R2, f	GTT TCT GCT TTC ACC ACT CCA	qPrimer Depot
IL1R2, r	GAG TCC AAT TTA CTC CAG GTC AG	qPrimer Depot
Irg1, f	GGCACAGAAGTGTTCCATAAAGT	qPrimer Depot
Irg1, r	GAGGCAGGGCTTCCGATAG	qPrimer Depot
TAP1, f	GCTGCCACATAACTGATAGCGA	qPrimer Depot
TAP1, r	GGACTTGCCTTGTTCCGAGAG	qPrimer Depot
TGFβ2, f	CCGCTGCATATCGTCCTGTG	qPrimer Depot
TGFβ2, r	AGTGGATGGATGGTCCTATTACA	qPrimer Depot

3.1.9. Geräte

Die im Rahmen der Experimente genutzten Laborgeräte wurden in Tab. 11 aufgelistet.

Tab. 11: Verwendete Laborgeräte.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller/Vertrieb</u>
Accurpette	VWR
Advia 2120i Hämatologiesystem	Siemens
Alinity c Klinisch-chemisches Untersuchungssystem	Abbott
Bakterieninkubator HERATHERM	Thermo Fisher Scientific
Bakterienschüttler (Certomat R, Certomat H)	Sartorius Stedim Biotech
FACSCanto II	BD Bioscience
Geldetektion (Gel Doc EZ)	Bio-Rad
Heizblock (Thermomixer C)	Eppendorf
Kryo-Einfriergerät Mr. Frosty, Nalgene	VWR
Mastercycler ProS	Eppendorf
Mixer MTS 2/4	IKA
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific
Orbitalschüttler	VWR
pH-Meter HI2211 pH/ORP Meter	HANNA Instrumente
Pipetten (2 µl, 10 µl, 2 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)	Gilson
PowerPac™ HC	Bio-Rad
Plattenleser (Opsys MR)	Dynex
qPCR (BioRad CFX96)	Bio-Rad
Sterilwerkband HERA Safe	Thermo Fisher Scientific
Taumelschüttler	VWR
Thermocycler C1000	Bio-Rad
Tischzentrifuge	Eppendorf
Transilluminator	MWG Biotech
Ultraschallbad SONOREX	Bandelin
Vortexer „Vortex Genie“	Scientific Industries
Waage AY612	Sartorius
Waage CPA1003P	Sartorius
Wasserbad	Julabo ED
Zellkulturinkubator	Memmert
Zentrifuge 5417 C/R	Eppendorf
Zentrifuge Allegra X-15R	Beckman Coulter
Zentrifuge Rotanta/RP	Hettich

3.1.10. Mausstämme

Die nachfolgend näher bezeichneten Mausstämme wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation verwendet (Tab. 12).

Tab. 12: Verwendete Mausstämme und Bezugsquellen. Angaben zu den verwendeten, kommerziellen Stämmen, sowie die eigens durch CRISPR/Cas9-Editierung erstellten Knock-out-Mausstämmen MYADM^{-/-} und TMEM206^{-/-}.

<u>Stamm</u>	<u>Quelle</u>
C57BL6/JRj	Janvier
C57BL6/NRj	Janvier
Myadm ^{-/-} (C57BL/6J-Myadm<em1Bosm>)	Zucht, AG Bosmann
TMCO1 ^{-/-} (C57BL/6NJ-Tmco1 ^{em1(IMPC)J/J} , Stock#: 027200)	Jackson Laboratories
TMEM206 ^{-/-} (C57BL/6J-Tmem206<em1Bosm>)	Zucht, AG Bosmann

3.2. Methoden:

3.2.1. Tiermodelle

3.2.1.1. Herstellung knochenmarkschimärer Mäuse

Für die Chimärengenerierung erfolgte eine zweimalige Ganzkörperexposition der Akzeptortiere mit Röntgen-Strahlen in einer Dosis von 5,5 Gy und einem Zeitabstand von vier Stunden zur Ablation des myeloproliferativen Systems. In der Zwischenzeit wurde Knochenmark der Spendertiere isoliert. Dazu wurden die Mäuse durch Kohlenstoffdioxid-Exposition getötet, Tibia und Femur isoliert und unter sterilen Bedingungen zunächst desinfiziert, eröffnet und dann mit Kochsalzlösung gespült. Nachfolgend erfolgte die Transplantation von $3 \cdot 10^6$ Knochenmarkszellen der Spendermäuse in 200 µl Volumen mittels adoptiven Transfer durch retrobulbäre Injektion unter Isoflurannarkose. Anschließend erfolgte eine Tierhaltung der Mäuse unter Pathogen-freien Bedingungen für 6 Wochen, um ein Anwachsen des Transplantats und die Ausprägung des Phänotyps des Spender-Knochenmarks sicherzustellen.

3.2.1.2. Endotoxämie

Für die Induktion der Endotoxämie wurde eine 10 mg/ml Stammlösung LPS in PBS angesetzt. Die Mäuse wurden gewogen und durch Schwanzmarkierung entsprechend gekennzeichnet. Ausgehend von dieser Stammlösung wurde den Mäusen eine Dosis von 10 µg/g Körpergewicht LPS injiziert. Für Überlebensstudien wurden die Mäuse dann für eine Dauer von 10 Tagen mehrmals täglich begutachtet und entsprechend der im Tierversuchsantrag festgelegten Abbruchkriterien bewertet. Die Bewertung des klinischen Schweregrades erfolgte nach den von Gonnert et al. (2011) festgelegten Kriterien anhand der spontanen Aktivität, der Haltung und der Reaktion auf externe Stimuli. Für peritoneale Zellanalysen wurden die Mäuse nach 24 h bis 48 h durch Kohlenstoffdioxidexposition getötet und das Peritoneum mit 10 ml PBS-EDTA gewaschen. Dazu wurde der Bauchraum oberflächlich desinfiziert und die obere Hautschicht mit Hilfe einer Schere soweit präpariert, dass ein freier Blick auf den unteren Bauchbereich des Tieres und die Einstichstelle der Nadel möglich ist. Dann wurden 10 ml PBS-EDTA mit Hilfe einer 24 G Nadel appliziert, das

Tier per Hand mehrmals seitlich hin und her bewegt und dann die Flüssigkeit mit einer 21 G Nadel abgesaugt.

3.2.1.3. Gewinnung von Knochenmarksmakrophagen

Zur Generierung von Knochenmarksmakrophagen (BMDM, *bone marrow derived macrophages*) wurden gesunde, unter SPF-Bedingungen gehaltene, 6 - 8 Wochen alte Mäuse durch Kohlenstoffdioxidinhalation euthanasiert. Nachfolgend wurden Tibia und Femur präpariert und in kaltes PBS überführt. Bis zur weiteren Behandlung wurden die Knochen auf Eis gelagert. Die Knochen wurden unter sterilen Bedingungen für etwa 20 s in einer Mischung aus 35 % (v/v) 1-Propanol und 25 % (v/v) Ethanol desinfiziert und mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Enden der Knochen mithilfe einer Knochenschere eröffnet und das Knochenmark über eine 24 G Kanüle mit kaltem RPMI-Medium herausgespült. Durch Zellen wurden mit sanftem Druck durch ein 100 µm Zellsieb gespült, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die Suspension wurde bei 300 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 10 ml BMDM-Medium sorgfältig resuspendiert. Die Zellen wurden in zehn Petri-Schalen mit BMDM-Medium bei einem Endvolumen von 10 ml pro Platte ausgesät. Nach drei Tagen wurden 10 ml frisches Medium je Platte zugegeben und die Zellen für insgesamt 7 Tage bei 37 °C, 5 % (v/v) CO₂, 96 % relative Luftfeuchtigkeit differenziert. Nach Ende der Differenzierung wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und mit PBS-EDTA, unter Zuhilfenahme eines Zellschabers, von den Platten gelöst. Die erhaltene Suspension wurde bei 300 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert, dann der Überstand verworfen und das Zellsediment in Makrophagenmedium resuspendiert. Die Zellen wurden unter Trypanblau-Exklusion in einer Neubauer *improved*-Zählkammer gezählt und in einer Dichte von 5x10⁵ Zellen/ml in 24-well Zellkulturplatten für die Stimulationsexperimente genutzt. Vor der Stimulation wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C, 5 % (v/v) CO₂, 96 % relative Luftfeuchtigkeit ruhen gelassen.

3.2.1.4. Bestimmung klinisch-chemischer Parameter und Blutbilder

Die Bestimmung der Blutbilder und Parameter der klinischen Chemie erfolgte im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz. Für die Messungen wurden die Mäuse mittels Isofluran-Inhalation zunächst betäubt. Die Blutentnahme erfolgte im Anschluss retrobulbär, wobei circa 600 µl Vollblut in Lithium-Heparin-Mikrovetten und weitere mindestens 100 µl Vollblut in Kalium-EDTA-Mikrovetten abgenommen wurden. Die Blutproben wurden sofort gut gemischt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Das EDTA-Blut wurde nach gründlicher Resuspension 1:3 in isotoner Natriumchloridlösung (0,9 % w/v NaCl) verdünnt und so für die Blutbild-Messung mittels Siemens Advia 2120i Hämatologiesystem eingesetzt. Zur Gewinnung von Blutplasma wurde das Heparin-Blut bei 2000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und in ein frisches Probengefäß überführt, ohne dabei Teile des Sediments mit zu transferieren. Das so gewonnene Plasma wurde für die Bestimmung der klinisch-chemischen Parameter mittels Abbott Alinity c System, eingesetzt.

3.2.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 CRISPR Mutagenese

3.2.2.1.1. Funktionsprinzip

Zur Aufklärung der Funktion bisher unbekannter Gene werden häufig Knock-out-Modelle verwendet. Dies können sowohl *in vitro*-Modelle wie Zelllinien sein als auch tierische Modelle. In einer Vielzahl der Anwendungen wird hierbei auf Nagetiermodelle zurückgegriffen. Für die Genom-Editierung wurden historisch verschiedene Methoden entwickelt. Ausnutzung der homologen Rekombination ermöglichte hierbei die erste präzise Form der Geneditierung, deren Anwendung jedoch durch die mit dem Mechanismus einhergehende Ineffizienz limitiert war (Szostak et al., 1983). Mit der Entdeckung von CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas (*CRISPR-associated*) stehen jedoch heute präzise und effiziente Werkzeuge zur Geneditierung zur Verfügung. Das CRISPR-System wurde zuerst 1987 durch japanische Wissenschaftler beschrieben, die eine ungewöhnliche genetische Struktur nahe des *iap*-Gens in *E. coli* bemerkten. Diese Struktur bestand aus alternierenden *repeat* und *non-repeat* DNA-Sequenzen, deren biologische Bedeutung zu diesem Zeitpunkt unbekannt war (Ishino et al., 1987). Die Funktion dieser Sequenzen wurde erst 20 Jahre später durch Sequenzierung aufgeklärt. In Bakterien dient das CRISPR/Cas-System als eine Art „adaptives Immunsystem“ gegen die Einschleusung fremden genetischen Materials, beispielsweise bei Infektion durch Bakteriophagen oder dem Transfer von Plasmiden (Barrangou et al., 2007; Fineran & Charpentier, 2012; Horvath & Barrangou, 2010; Wiedenheft, 2012; Wright et al., 2016).

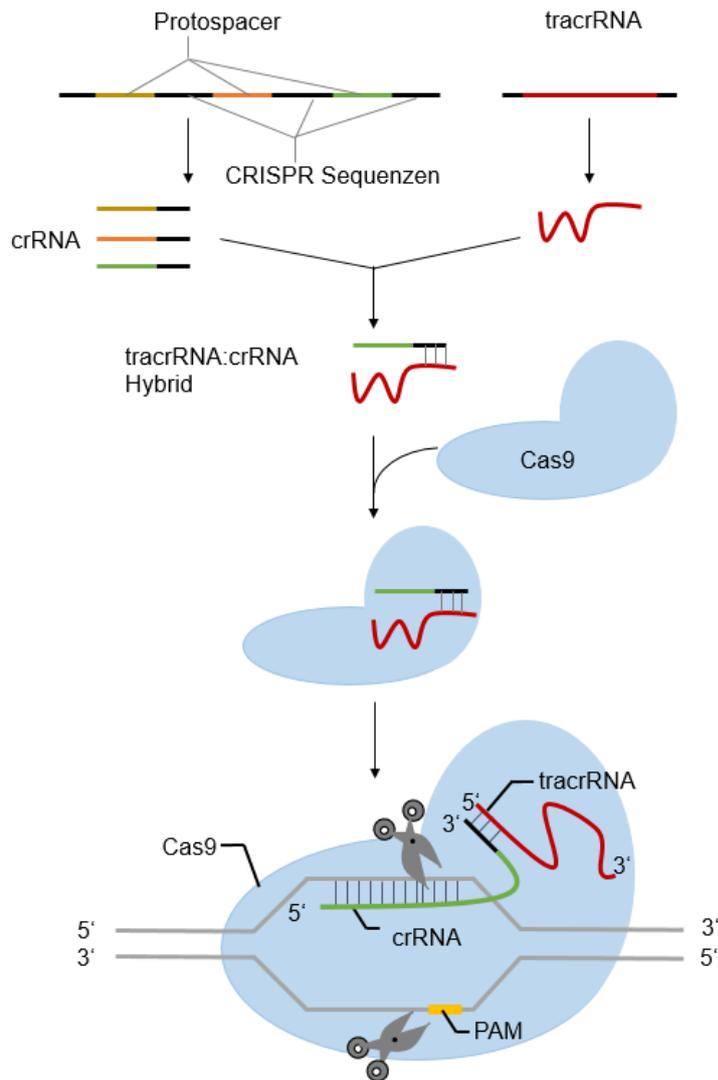


Abb. 5: Funktionsprinzip von CRISPR/Cas9. Protospacer-Sequenzen im CRISPR-Locus, die Sequenzen zellfremder DNA enthalten, werden zusammen mit den CRISPR-Wiederholungssequenzen transkribiert und in reife crRNAs prozessiert. Die crRNAs hybridisieren mit der tracrRNA und werden in die Nuclease Cas9 geladen. Nach Hybridisierung der crRNA an die Zielsequenz und Erkennung der Nuclease-spezifischen PAM-Sequenz, wird ein Doppelstrangbruch induziert. Adaptiert nach: Sander & Joung, 2014.

Cas9: CRISPR associated protein 9, crRNA: CRISPR RNA, PAM: protospacer adjacent motif, tracrRNA: transactivating CRISPR RNA.

CRISPR-Systeme werden in zwei Klassen mit jeweils drei Typen eingeteilt (Wright et al., 2016). Klasse I umfasst die Typen I, III und IV, während Klasse zwei Typen II, V und VI umfasst. Die unterschiedlichen Typen basieren auf Nutzung verschiedener Cas-Proteine, teilen sich jedoch ihr Funktionsprinzip, das auf DNA-codierter und RNA-vermittelter Nuclease-aktivität beruht. Der CRISPR-Locus, der das System codiert, enthält kurze, palindromische Wiederholungssequenzen (*repeats*) mit typischerweise 28 – 37 bp (Basenpaaren) Länge, die durch Platzhaltersequenzen (*spacer*) getrennt werden. Die Wiederholungssequenzen leiten sich von fremdem genetischem Material ab und ermöglichen die spezifische Degradierung entsprechenden Materials durch Nuclease-Aktivität. Eine AT-reiche Sequenz, die als *leader*-Sequenz bezeichnet wird, liegt *upstream* des CRISPR-Locus und enthält Promotor-Elemente und Signalsequenzen, die notwendig für die Transkription der crRNAs (CRISPR RNA) und Integration fremder RNA-Sequenzen in den CRISPR-Locus sind. Der Leader-Sequenz und dem CRISPR-Locus vorgeschaltet

werden die für das jeweilige System typischen Cas-Gene codiert. Cas-Proteine assoziieren mit den vom CRISPR-Locus transkribierten crRNAs und bilden den RNA-geleiteten Effektor-Komplex. Die ursprüngliche Einteilung der CRISPR-Systeme in die drei Typen I, II und III beruhte auf dem jeweiligen Signaturgen *cas3*, *cas9* oder *cas10* (Wright et al., 2016; Makarova & Koonin, 2015). Im Folgenden soll insbesondere das oft für Genomeditorung genutzte Typ II-System aus CRISPR/Cas9 näher betrachtet werden.

Die Abwehrfunktion gegen fremdes genetisches Material in Bakterien beruht auf drei wesentlichen Schritten. Im ersten Schritt, der Akquisition, wird fremde DNA zellulär durch Cas-Nuclease in kleine Fragmente, die als Protospacer-Sequenzen bezeichnet werden, prozessiert. Diese Fragmente werden als Spacer-Sequenzen in den CRISPR-Locus integriert. Die Auswahl von Spacer-Sequenzen beruht auf der Erkennung einer spezifischen Sequenz, der PAM (*protospacer adjacent motif*) im eingeschleusten viralen Genom und ist Cas-Protein spezifisch. Protospacer-Sequenzen, die in den CRISPR-Locus integriert wurden, enthalten keine PAM-Sequenz. Dies ermöglicht die Unterscheidung zwischen Fremd- und Eigen-DNA.

Im zweiten Schritt, der Biogenese, wird der CRISPR-Locus in eine Vorläufer-crRNA (pre-crRNA) transkribiert. TracrRNA (*transactivating CRISPR RNA*) hybridisiert an die *repeat*-Sequenzen der crRNA und endogene Rnase III spaltet den durch Cas9 stabilisierten Komplex, wodurch die reife crRNAs gebildet werden, die jeweils eine Spacer-Sequenz und eine partielle *repeat*-Sequenz enthalten.

Im dritten Schritt, der Interferenz, leitet die crRNA die Cas9-Nuclease zu einer komplementären Sequenz fremder DNA in Nähe einer PAM-Sequenz. Nachfolgend wird ein Doppelstrangbruch durch die Nuclease-Aktivität der Cas9 induziert. Cas9 enthält zwei Nuclease-Domänen, HNH (bezeichnet nach charakteristischen Histidin und Asparagin-Resten) und RuvC, die jeweils den zur crRNA komplementären und nicht-komplementären Strang 3 bp *upstream* der PAM-Sequenz schneiden. PAM-Sequenzen sind 2-5 Nucleotide lang und spezifisch für jeden Subtyp und jede Bakterienspezies. Die häufig für Geneditierung genutzte *SpCas9* (*Streptococcus pyogenes*) nutzt als PAM die Nucleotidsequenz NGG, wobei N jedes der vier Nucleotide sein kann, G ist Guanosin.

Jinek et al. haben 2012 die Basis für die Nutzung von CRISPR/Cas9 als Genomeditorungswerkzeug gelegt, indem sie postulierten, dass der crRNA:tracrRNA-Komplex durch Fusion beider Sequenzen synthetisch zugänglich ist. Dabei wird das 3'-Ende der crRNA mit dem 5'-Ende der tracrRNA fusioniert. Diese chimäre RNA wird als (*single*) *guide* RNA bezeichnet (Jinek et al., 2012; Wright et al., 2016).

3.2.2.1.2. Methodischer Ablauf

Für die Editierung der Zielgene MYADM, TMEM206 und Mfsd1 wurde das kommerziell erhältliche klonierungsfreie CRISPR-System der Firma iDT (*integrated DNA Technologies*) verwendet. Die crRNAs wurden mit Hilfe des Tools CRISPOR sowie UCSC Genome Browser designt und crRNAs mit möglichst hohem Score, das heißt geringem zu erwartenden off-target-Effekt, ausgewählt.

Für die Mutagenese wurden zwei separate Injektionsmischungen, eine für TMEM206 (Mix 1) und eine kombinierte für MYADM und Mfsd1 (Mix 2) unter sterilen, RNase-freien Bedingungen in RNase-freiem Duplex-Puffer angesetzt (Tabelle 13). Beide Mischungen enthalten jeweils vier gRNAs, entsprechend zweier die zu deletierende Sequenz flankierender crRNA-Paare. Für die Generierung der Injektionsmischung wurden zunächst die crRNAs einzeln mit einer stöchiometrischen Menge tracrRNA (Arbeitskonzentration 12,5 ng/µl) durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min und anschließendes Abkühlen auf Raumtemperatur, hybridisiert. Die so erhaltenen gRNA-Spezies wurden in einem Reaktionsgefäß kombiniert und mit Cas9 mRNA in einer Endkonzentration von 25 ng/µl versetzt. Nachfolgend wurde

rekombinantes Cas9-Protein einer Stammkonzentration von 10 µg/µl 1:10 in Nuclease-freiem Wasser vorverdünnt. Die Injektionsmischungen wurden unmittelbar vor Mikroinjektion in die Zygoten mit Cas9 in einer Endkonzentration von 50 ng/µl versetzt. Die Mikroinjektionen wurden von der *Transgenic Core Facility* des TARC in Mainz (Dr. L. Eshkind) durchgeführt. Die behandelten Zygoten wurden für 24 h unter sterilen Bedingungen kultiviert, bevor sie in scheinsschwangere C57B6/J-Weibchen transplantiert wurden.

Tab. 13: Arbeitsfluss und Reagensschema für die Genomeditierung mittels klonierungsfreiem CRISPR/Cas9. Für den Injektionsmix wurden die im ersten Schritt hergestellten crRNA:tracrRNA-Hybride kombiniert, mit Cas9 mRNA versetzt und auf das Zielvolumen aufgefüllt. Erst kurz vor der Mikroinjektion wurde Cas9 Protein zugegeben.

<u>Arbeitsschritt</u>	<u>Mix</u>
crRNA:tracrRNA-Hybridisierung	5,0 µl Duplex Puffer 2,5 µl crRNA 2,5 µl tracrRNA
Kombination der Hybride	4x10µl = 40 µl
Zugabe von Cas9 mRNA	5 µl Cas9 mRNA (500 ng/µl)
Auffüllen mit Wasser	Auf 95 µl Endvolumen
Zugabe von Cas9	5 µl 1:10 Cas9

3.2.2.2. Genotypisierung von Mäusen

3.2.2.2.1. Lyse von Ohrbiopsien

Ohrbiopsien wurden in 1,5 ml Reagiergefäßen von Seiten des Zuchtbetriebs angeliefert. Die Proben wurden durch kurze Zentrifugation bei 2500 rpm für eine Minute herunterzentrifugiert. Dann wurden 40 µl Biopsie-Lysepuffer zugegeben und der Ansatz für 20 min unter Schütteln bei 350 U/min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden 40 µl Biopsie-Neutralisationspuffer zugegeben, der Ansatz gründlich durchmischt und die so behandelten Proben bis zur Durchführung der PCR bei -20°C gelagert.

3.2.2.2.2. Genotypisierungs-PCR

Die Genotypisierung wurde unter Verwendung des kommerziell erworbenen, 2-fach konzentrierten DreamTaq PCR Master Mix durchgeführt. Die Zusammensetzung eines typischen 25 µl-Reaktionsansatzes kann der Tab. 14 entnommen werden.

Tab. 14: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die Genotypisierung. Die PCR-Reaktion wurde in einem 25 µl-Ansatz unter Verwendung von DreamTaq PCR Master Mix durchgeführt.

<u>Komponente</u>	<u>V / µl</u>
DreamTaq PCR Master Mix (2x)	12,5
DMSO	0,25
Vorwärtsprimer [50 µM]	0,1
Rückwärtsprimer [50 µM]	0,1
Template-DNA	1
Nuklease-freies Wasser	11,05

Für die Genotypisierung der unterschiedlichen Mausstämme wurden jeweils spezifische Primerkombinationen verwendet, die mutiertes und Wildtyp-Allel detektieren. Die PCR-Bedingungen wurden jeweils hinsichtlich der Schmelztemperaturen der entsprechenden Primerpaare optimiert. Die entsprechenden Primerkombinationen und zugehörigen Hybridisierungstemperaturen können Tab. 15 entnommen werden.

Tab. 15: Primerkombinationen für die Genotypisierung von Knock-out-Mausstämmen.

Alle Primersequenzen sind in 5'→3'-Richtung angegeben. Für jedes Primerpaar ist die Annealing-Temperatur (T_a) in °C angegeben.

<u>Zielgen</u>	<u>Allel</u>	<u>Vorwärtsprimer</u>	<u>Rückwärtsprimer</u>	<u>T_a</u>
TMCO1	Wt	CCATTGTTTTAGTATGGAGTAAGCA	CCATTGACAGGTCTCTATTGTTGT	58,0
TMEM206	Mut	CCATTGTTTTAGTATGGAGTAAGCA	TGAAATTTAAATGTGGCA GCA	58,8
	Wt	TCTCCCTCACTGCTCATCGA	AGCTTTAGAACCGGGCAGAC	
MYADM	Mut	TCTCCCTCACTGCTCATCGA	TCCGAGTTCTCAACCACCTGC	55,0
	Wt	CGGATGAGGGCTGGGTACCT	TCGCCATGACAGGGGGAAGT	
	Mut	CGGATGAGGGCTGGGTACCT	GATATTAGCTGCAGGAGGCGGA	

Der Ablauf der PCR erfolgte gemäß den in Tab. 16 angegebenen Bedingungen.

Tab. 16: Ablaufschema und Bedingungen der Genotypisierungs-PCRs. Die PCR-Reaktion wurde unter Verwendung von DreamTaq PCR Master Mix gemäß dem in Tab. 14 aufgeführten Schema angesetzt.

<u>Prozessschritt</u>	<u>T / °C</u>	<u>t</u>	<u>Zyklenzahl</u>
Initiale Denaturierung	94 °C	4 min	1
Denaturierung	94 °C	30 s	30
Hybridisierung	Primer-abhängig	30 s	
Kettenverlängerung	72 °C	1 min	1
Finale Extension	72 °C	5 min	
Kühlen	8 °C		1

Die Auftrennung der generierten PCR-Produkte erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese im 2%-igen Agarosegel, die Detektion durch Färbung mittels RotiSafe Gel Stain unter UV-Licht.

3.2.2.3 Phusion®-PCR

Zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen für die nachfolgende Sequenzierung muss eine Polymerase mit Korrekturlesefunktion (3'-5'-Exonucleaseaktivität) verwendet werden, um die Fehlerrate in der PCR möglichst gering zu halten. Für diese PCR-Amplifikationen wurde auf Phusion®-Polymerase zurückgegriffen. Die PCR wurde gemäß Herstellervorgabe in 25 µl-Ansätzen durchgeführt. Die Mengen der jeweiligen Komponenten pro Ansatz können der Tabelle 17 entnommen werden.

Tab. 17: Komponenten der Phusion®-PCR und Erstellung des PCR-Ansatzes. Für die Durchführung dieser PCR wurde auf den kommerziellen Phusion Master Mix HF zurückgegriffen.

<u>Komponente</u>	<u>Menge pro 25 µl Reaktion</u>	<u>Endkonzentration</u>
10 µM Vorwärtsprimer	1,25 µl	0,5 µM
10 µM Rückwärtsprimer	1,25 µl	0,5 µM
DMSO	0,75 µl	3 % (v/v)
2x Phusion Master Mix HF	12,5 µl	1x
Template DNA	1 µl	< 250 ng
Nuklease-freies Wasser	auf 25 µl Zielvolumen	

Die Reaktionsansätze wurden gemischt und in 250 µl-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Hybridisierungstemperaturen für jedes Primerpaar wurden zuvor über einen Temperaturgradienten bestimmt. Die PCRs wurden nach dem in Tab. 18 angegebenen Programm durchgeführt.

Tab. 18: Durchführung der Phusion®-PCR. Thermocycling-Bedingungen. Bis auf die Hybridisierungstemperatur in der Amplifikation wurden stets identische PCR-Bedingungen verwendet. Optimale Hybridisierungstemperaturen für die einzelnen Primerpaare wurden zuvor mittels Temperaturgradient ermittelt.

<u>Schritt</u>	<u>T / °C</u>	<u>t / s</u>
Initiale Denaturierung	98	30
Amplifikation, 30 Zyklen	98 °C	10 s
	45 – 72 °C, je nach Primerpaar	20 s
	72 °C	20 s
Finale Extension	72 °C	5 min
Kühlen	4 °C	Bis zur Entnahme

3.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung via PCR amplifizierter DNA-Fragmente erfolgte durch Gelelektrophorese in 2%-igen Agarose-Gelen. Dafür wurde 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, für 5 min bei Raumtemperatur abkühlen gelassen, mit 5 µl je 100 ml Gel *RotiSafe Gel Stain* versetzt und luftblasenfrei in den Gelschlitzen gegossen. Ein 20-Taschen Gelkamm wurde im Gel platziert und das Gel für 20 min bei Raumtemperatur aushärten gelassen. Dann wurde das Gel zur Vermeidung von Austrocknung in die mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer überführt. Für den Gellauf wurden 20 µl PCR-Reaktion und pro Tasche aufgetragen. Zur Evaluierung der Fragmentgröße wurden 5 µl eines 100 bp-DNA-Markers mit aufgetragen. Der Gellauf erfolgte anschließend bei 100 V/cm Gel für 30 – 45 min bei Raumtemperatur. Die Detektion der Gelfragmente erfolgte unter Transillumination mittels UV-Licht.

3.2.2.5. Extraktion und Reinigung von PCR-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von mittels Gelelektrophorese im Agarose-Gel aufgetrennter DNA-Fragmente erfolgte mittels QIAquick Gel-Extraktionskit gemäß Herstellervorgabe. Dazu wurden die entsprechenden Produktbanden zunächst unter UV-Transillumination aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Masse der ausgeschnittenen Gelfragmente wurde anschließend bestimmt und je 300 µl Puffer QG pro 100 mg Gel zugegeben. Die Gelfragmente wurden für 15 min bei 50 °C unter gelegentlichem Schütteln bis zur vollständigen Auflösung inkubiert. Nachfolgende wurden 100 µl je 100 mg Gel Isopropanol zugegeben und der Ansatz gründlich durchmischt. Die Mischung wurde auf die QIAquick-Säule aufgetragen. Dann wurde die Säule bei 17900 xg für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Durchfluss anschließend verworfen. Die Säule wurde mit 500 µl Puffer QG und 750 µl Puffer PE gewaschen und der Durchfluss jeweils verworfen. Zur Elution der DNA wurde die Säule in ein sauberes, Nuklease-freies 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 50 µl Wasser ins Zentrum der Membran pipettiert, die Säule bei Raumtemperatur für 4 min inkubiert und dann bei 17.900 x g für 1 min zentrifugiert. DNA-Konzentration und Reinheit des Eluats wurden fotometrisch bei 260 nm/280 nm bestimmt.

3.2.2.6. Sequenzierung

Die im Agarose-Gel aufgetrennten und aus dem Gel gereinigten DNA-Fragmente wurden bei *eurofins* unter Verwendung des „SUPREMERUN“ sequenziert. Dazu wurden je 40 ng PCR-Fragment in einem Volumen von 20 µl geliefert. Zusätzlich wurden 20 µl eines zielspezifischen Sequenzierprimers mit einer Konzentration von 10 pmol/µl beigegeben. Die für die jeweiligen Zielsequenzen verwendeten Sequenzierprimer können der Tabelle 19 entnommen werden.

Tab. 19: Sequenzierungsprimer für TMEM206 (Exon 2) und MYADM (Exon 3). Die Angabe der Primersequenz erfolgt jeweils in 5'→3'-Richtung.

<u>Zielgen</u>	<u>Vorwärtsprimer</u>	<u>Rückwärtsprimer</u>
TMEM206	ACGGTTATGTGGATGGCAG	GCCTCCAGCTGTAGCAG
MYADM	ATGAGGGCTGGGTACCT	TCGCCATGACAGGGGGAAGT

3.2.2.7. RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde unter Verwendung des Analytik Jena innuPrep RNA MiniKit weitgehend nach Herstellervorgabe bei Raumtemperatur durchgeführt. Dafür wurden 5×10^5 Zellen, einzig abweichend vom Herstellerprotokoll, in 250 µl Lysepuffer unter Schwenken lysiert. Das Lysat wurde auf die Säule „D“ gegeben und für 2 min bei 10.000xg zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und der Durchfluss mit einer äquivalenten Menge RNAase-freien 70% (v/v) Ethanol versetzt und durch Pipettieren vermischt. Das Gemisch wurde auf die Säule „R“ gegeben und für 2 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 µl Puffer HS und 750 µl LS durch Zentrifugation bei 10.000xg für je 1 min gewaschen. Zur Entfernung restlichen Ethanols wurde die Säule für 3 min bei 10.000 x g trocken zentrifugiert. Dann wurden pro Säule 50 µl Nuclease-freien Wassers zugegeben, für 1 min inkubiert und dann bei 6.000xg für 1 min zentrifugiert. Die RNA-Konzentration des Eluats wurde anschließend fotometrisch bestimmt und die Proben bis zur cDNA-Synthese auf Eis gehalten oder bei -20 °C weggefroren.

3.2.2.8. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung des „High-Capacity cDNA Reverse Transcription“ Kit von Applied Biosystems nach Herstellervorgabe. Dazu wurden die RNA-Konzentrationen der Proben fotometrisch bei 260 nm am Nanodrop 2000c bestimmt und die Konzentrationen auf 0.2 – 2 µg RNA je 20 µl Reaktion eingestellt. Dazu wurde zunächst Nuklease-freies Wasser in 0.25 ml-Einzeldeckelgefäßen vorgelegt und dann die RNA in diesem zu einem Zielvolumen von 10 µl bis zur festgelegten RNA-Menge verdünnt. Anschließend wurde die Reaktion mit je 10 µl cDNA-Synthese-Mastermix (Puffer, dNTPs, *random Primers*, Reverse Transkriptase) auf das festgelegte Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die cDNA Synthese wurde anschließend in einem *Thermocycler* (Mastercycler pro S, Eppendorf) gemäß folgendem Schema durchgeführt (Tab. 20).

Tab. 20: Ablauf der cDNA-Synthese. Temperatur und Zeitverlauf im *Thermocycler*.

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur / °C</u>	<u>Dauer / min</u>
I	25	10
II	37	120
III	85	5
IV	10	∞

Für die Anwendung in der quantitativen PCR wurde die cDNA final 1:5 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt.

3.2.2.9. Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

Für die qPCR wurde die cDNA auf eine Zielkonzentration von 2- 20 ng/µl verdünnt. Die qPCR wurde nach Herstellerangabe unter Verwendung des zweifach konzentrierten „iQ SYBR Green“ von BioRad, durchgeführt. Je 2 µl cDNA wurden in Doppelbestimmung untersucht. Das Zielvolumen je Reaktion wurde auf 20 µl festgelegt. Jede Reaktion enthielt Zielgen-spezifische *forward* und *reverse* Primer in einer Konzentration von 0.5 µM. Die Spezifität der Primer wurde durch Aufnahme einer Schmelzkurve im Anschluss an die PCR evaluiert. Die quantitative PCR wurde an einer C1000 Station von BioRad mit CFX96 Detektionssystem gemäß nachfolgendem Programm durchgeführt (Tab. 21).

Tab. 21: Ablauf der qPCR. Temperatur-, Zeit- und Zyklenverlauf während der quantitativen PCR.

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur / °C</u>	<u>Dauer / s</u>	<u>Zyklen</u>
I	95	180	1
II	95	15	40
III	58	30	
IV (Schmelzkurve)	60 – 95 (+0,5 °C/Schritt)	5	70

3.2.3. Mikrobiologie

3.2.3.1. Bestimmung der bakteriellen Zelldichte von *E. coli* in Suspension

Die bakterielle Lebendzellendichte in einer Suspension, beispielsweise der Peritoneallavage, lässt sich durch die Anzahl Kolonien-bildender Einheiten (KBU) ermitteln. Dafür wird die entsprechende Suspension steril entnommen und entlang einer Verdünnungsreihe von 1:10⁰ bis 1:10⁴ verdünnt und jeweils 50 µl der erhaltenen Suspension mittels Drigalski-Spatel gleichmäßig auf Columbia Blut-Agar ausplattiert. Nach Abtrocknung der Oberfläche werden die Platten umgedreht bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag werden die Platten dem Inkubator entnommen und die Anzahl der auszählbaren Kolonien bestimmt. Durch die Anzahl der erhaltenen Kolonien pro bekannter Verdünnung und bekanntem Volumen lässt sich die Zelldichte in Suspension (KBU/ml) berechnen.

3.2.3.2. Rekombinante Expression von ScPPX

Für die Expression rekombinanter ScPPX wurde eine Vorkultur *E. coli* MJG317 in LB-Medium mit Ampicillin (final 1 µg/ml) angesetzt. Dazu wurden 10 ml des Mediums mit etwa 10 µl von einer in Glycerin cryokonservierten Kultur beimpft und bei 37 °C unter Schütteln bei 150 U/min über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 l frisches LB-Medium mit derselben Endkonzentration Ampicillin versetzt und mit der Vorkultur beimpft. Diese Hauptkultur wurde in Erlenmeyerkolben bei 150 rpm, 37 °C geschüttelt, bis eine optische Dichte der Kultur von OD₆₀₀ von etwa 0.6 erreicht war. Anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert und die Kultur bei 120 U/min bei 37 °C über Nacht weiter geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4500 g, 20 min, 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

3.2.3.3. Zellaufschluss von *E. coli*

Das Zellsediment wurde auf Eis aufgetaut in 10 ml His-Trap-Bindungspuffer vollständig resuspendiert. Zusätzlich wurden Lysozym (1 mg/ml) und Benzonase (50 U/ml) zugegeben und die Mischung unter gelegentlichem Schütteln auf Eis für 90 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch indirekte Sonifikation unter Kühlung mit Eis-Wasser in 2 ml-Reaktionsgefäßen lysiert. Dafür wurde eine Amplitude von 90 % gewählt und die Zellen für drei Zyklen mit jeweils drei Minuten Dauer behandelt. Für jeden Zyklus wurde eine An-/Aus-Pulsung von je 10s gewählt. Das Eiswasser wurde während der Sonifikation regelmäßig erneuert und die Suspension zwischen den Zyklen regelmäßig auf Eis gekühlt. Die erhaltene Suspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Vor der Aufreinigung durch Affinitätschromatografie wurde die Ultraschalllyse für einen weiteren Zyklus wiederholt. Nach dem Zellaufschluss wurde die Suspension bei 10000 x g für 20 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Affinitätschromatografie auf Eis gehalten.

3.2.4. Proteinbiochemische Methoden

3.2.4.1. Partikel-basierte Zytokinquantifizierung

Multiplex-Cytokinbestimmung wurde unter Verwendung des ProcartaPlex 20-Plex Kits gemäß Herstellervorgaben durchgeführt. Dazu wurden Antigen-Standards entsprechend der Anleitung angesetzt und verdünnt. Magnetische Mikropartikel wurden je 1:50 vorverdünnt, für 30 s gemischt und in die Platte vorgelegt. Der Überstand wurde entfernt. Dann wurde, soweit benötigt, der nächste Partikel-Typ zugegeben und analog verfahren, bis alle Messschächte der Platte mit den benötigten Partikeln bestückt waren. Anschließend wurden 50 µl des Zellkulturüberstands zugegeben, die Platte verschlossen und für 120 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Platte wurde nachfolgend dreimal mit 1x Waschpuffer gewaschen und anschließend 25 µl des vorverdünnten Detektionsantikörper-Gemischs je Reaktion zugegeben. Die Platte wurde für weitere 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt, dreimal gewaschen und dann mit je 50 µl Streptavidin-Phycoerythrin pro Messvertiefung versetzt. Die Platte wurde unter Schütteln für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie erneut dreimal gewaschen und die Partikel dann in 120 µl *Reading Buffer* für 5 min unter Schütteln bei Raumtemperatur resuspendiert wurden. Die Proben wurden anschließend auf einem Bio-Rad BioPlex-200 System gemessen.

3.2.4.2. Affinitätschromatographie von His₆-PPX an Ni-NTA

Für die Affinitätschromatographie der in *E. coli* exprimierten, rekombinanten ScPPX, mittels ÄKTA Pure wurde die in 20 % (v/v) Ethanol gelagerte Ni-NTA-Säule (HisTrap FF *crude*, 1ml) zunächst für je 10 Säulenvolumina mit Wasser gewaschen und dann mit Bindungspuffer äquilibriert. Um Gasblasenbildung und Ablagerungen im System zu vermeiden wurden alle Lösungen filtriert und unter Vakuum entgast. Nach längerem Stehen wurden die Lösung vor der Verwendung erneut im Ultraschallbad für 10 min entgast. Nach Äquilibrierung der Säule erfolgte die Applikation des über Zentrifugation und Sterilfiltration mit einem 0.2 µm-Spritzenvorsatzfilter geklärten *E. coli*-Lysats mittels 50 ml-*Superloop*. Der *Superloop* wurde einseitig mit Bindungspuffer befüllt und dann ein Probenvolumen von 10,5 ml geklärten *E. coli*-Lysats in den *Superloop* überführt. Die Probe wurde unter Bindungspufferfluss aus dem *Superloop* auf die Ni-NTA Säule appliziert. Der Durchfluss wurde in Fraktionen zu 5 ml Volumen gesammelt. Die gewonnenen Fraktionen wurden auf Eis gekühlt gelagert. Nach der Applikation wurde die Säule für 15 Säulenvolumina mit Bindungspuffer gewaschen, um ungebundene und nur unspezifisch schwach gebundene Proteine zu entfernen. Die

Waschfraktionen wurden in einem Volumen von je 5 ml gesammelt. Nachfolgend erfolgte die isokratische Elution über 15 Säulenvolumina mit einer Konzentration von 500 mM Imidazol. Die Elutionsfraktionen wurden zu je 3 ml Volumen gesammelt. Nach der erfolgreichen Elution des Proteins, die über die In-Prozess-Messung der UV-Absorption über einen in der ÄKTA verbauten Sensor, verfolgt wurde, wurde die Säule mit Bindungspuffer gewaschen und nachfolgend lagerfertig gemacht. Dazu wurde die Säule mit wässriger 1 M Natriumhydroxid-Lösung und Wasser für jeweils 10 Säulenvolumina gewaschen. Anschließend wurde sie in 20 % (v/v) Ethanol überführt und bei 4 °C gelagert.

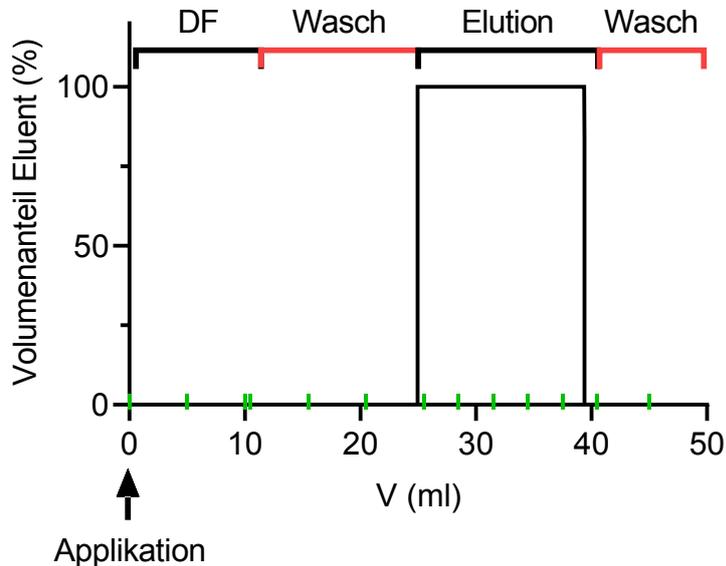


Abb. 6: Geplantes Ablaufschema der Affinitätschromatographie von ScPPX. Nach Applikation von 10,5 ml des E. coli Lysats auf die zuvor mit Bindungspuffer äquilibrierte Säule wurden die Durchfluss (DF)-Fraktionen (Fraktionen sind in grün auf der Abszisse markiert) zu je 5 ml Volumen gesammelt. Nachfolgend wurde die Säule für 15 Säulenvolumen gewaschen. Auch diese Fraktionen wurden zu je 5 ml Volumen gesammelt. Die Elution erfolgte in 3 ml Fraktionen über 15 Säulenvolumen isokratisch mit 500 mM Imidazol. Nachfolgend wurde die Säule erneut mit Bindungspuffer gewaschen und äquilibriert.

DF: Durchfluss, Wasch: Waschfraktion, Elution: Elutionsfraktion, V: Elutionsvolumen.

3.2.4.3. Entsalzung / Pufferwechsel von Proteinproben

Die Entsalzung und primär auch die Entfernung des Imidazol-haltigen Elutionspuffers aus den Elutionsfraktionen erfolgte durch Verwendung von PD-10 Säulen nach Vorgaben des Herstellers (GE Healthcare). Dafür wurde die Säule in einen Adapter gestellt, die Säule beidseitig geöffnet und der Lagerungspuffer dekantiert. Die Säule wurde viermal mit PPX-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH7,5; 50 mM KCl) gewaschen. Dafür wurde die Säule dreimal bis zur Öffnung mit Puffer gefüllt und der Puffer vollständig ins Säulenbett einsickern lassen. Im letzten Waschriff wurde die Säule erneut mit Puffer befüllt und dann für 2 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Ein Maximalvolumen von 2.5 ml Probe wurde auf die Säule appliziert und vollständig ins Säulenbett einsickern lassen. Die Elution erfolgte durch Zentrifugation für 2 min bei 1000 x g

3.2.4.4. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Methode

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den chromatografisch erhaltenen Elutionsfraktionen erfolgte nach der Bradford-Methode unter Verwendung kommerziell erwerbbarer BradfordUltra-Reagenzes (Expedeon). Zur absoluten Quantifizierung wurde

eine Eichgerade mit bekannten Proteinkonzentrationen unter Verwendung von Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) im Bereich von 0,3 mg/ml bis 1,5 mg/ml Protein erstellt. Eichgerade und Proben wurden in jeweils technischen Duplikaten in einer 96-well Mikrotiterplatte vorgelegt, 300 µl Bradford-Reagenz zugegeben und die Absorption bei 595 nm gemessen. Die absolute Quantifizierung der gemessenen Proben erfolgte durch Auftragung der für die Eichproben gemessenen Absorption gegen die bekannte Konzentration. Mittels der für die lineare Regression erhaltenen Gleichung konnten die Probenkonzentrationen anhand der erhaltenen Absorption rechnerisch bestimmt werden.

3.2.4.5. Aktivitätsbestimmung rekombinanter ScPPX

ScPPX wurde mittels Plasmid rekombinant in *E. coli* exprimiert und über His₆-Tag mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA aus dem Überstand des Zellaufschlusses gereinigt. Nachfolgend wurde die Aktivität des rekombinant hergestellten Enzyms *in vitro* durch Verdau von L-PolyP bestimmt. Dazu wurden die Hauptelutionen einzeln auf ihre Aktivität getestet. Die Bestimmung erfolgte jeweils als Doppelbestimmung. Das Messprinzip beruht auf der enzymatischen Freisetzung von Monophosphat aus dem L-PolyP durch die Aktivität der PPX. Die Konzentration des enzymatisch freigesetzten Monophosphats kann mittels BioMol Green Assay bestimmt werden.

Für die Bestimmung wurden 30 µl der zu testenden Elutionsfraktion mit bekannter Proteinkonzentration (Bestimmung mittels Bradford-Methode) mittels PPX-Reaktionspuffer auf ein Testvolumen von 10 ml gebracht und im Wasserbad für 5 min auf 37 °C temperiert. Von dem Reaktionsgemisch wurde ein Nullwert entnommen. Dann wurde L-PolyP in einer Zielkonzentration von 100 µM zugegeben. Minütlich wurde ein Testvolumen von 40 µl aus der Reaktion entnommen und in eine Mikrotiterplatte überführt. Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion wurden in der Platte je Messvertiefung 10 µl 1 M HCl vorgelegt. Die Reaktion wurde über einen Zeitraum von 10 min verfolgt. Anschließend wurden jeweils 100 µl BioMol Green Reagenz zugegeben. Die Platte wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann mittels Plattenleser die Absorption bei 630 nm bestimmt. Die Bestimmung der Monophosphatkonzentration erfolgte anhand einer Eichgerade mit bekannten Monophosphatkonzentrationen im Bereich von 0,25 µM bis 40 µM Monophosphat. Die Berechnung der PPX-Aktivität erfolgte anhand der innerhalb von 10 min freigesetzten Monophosphatstoffmenge, bezogen auf die mittels Bradford-Test bestimmte, eingesetzte Proteinmenge (pmol Pi/min/mg PPX).

3.2.4.6. Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen. Dazu werden die Proteine in reduzierendem Milieu unter Aufkochen zunächst denaturiert und durch SDS mit einer negativen Gesamtladung versehen. Dadurch wandern die Proteine einheitlich, aufgetrennt nach ihrer Größe in Richtung Anode. Das Wanderverhalten kann durch die Prozentigkeit des Polyacrylamidgels und den Vernetzungsgrad bestimmt werden. Unter denaturierenden Bedingungen wandern kleinere Proteine schneller in Richtung Anode.

Für die Gelelektrophorese von Proteinproben wurden diese mit Lämmli-Puffer versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Danach wurden die Proben bis zum Auftrag auf das Gel auf Eis gelagert. Für das PAGE-Gel wurde die Gelkammer vorbereitet und mit einer Gummidichtung gegen auslaufen abgedichtet. Dann wurden 10 ml 12 % Trenngel in die Kammer gegossen, mit Isopropanol überschichtet und für 20 min bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Nachfolgend wurde das Isopropanol abgegossen und mit Filterpapier vollständig entfernt. 5 ml eines 6 % Sammelgels wurden in die Kammer gegossen und

luftblasenfrei ein Gelkamm hinzugefügt. Auch das Sammelgel wurde für 20 min bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Das fertige Gel wurde in die mit SDS-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer vertikal eingesetzt, der Gelkamm unter Flüssigkeit entfernt und die Geltaschen mit Laufpuffer gespült. Dann wurden je 30 µl Probe gegen einen Proteinmarker aufgetragen und die Proteine bei 100 V für 90 min aufgetrennt. Danach wurde das Gel aus der Kammer entnommen, mit Wasser gewaschen und die Proteinbanden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G250-Fertiglösung (BioRad) detektiert.

3.2.4.7. Bestimmung des Endotoxingehalts von Proteineluaten

Die Bestimmung des Endotoxingehalts in einzelnen und kombinierten Elutionsfraktionen der chromatographischen PPX-Reinigung (Kap. 3.2.4.2.) erfolgte unter Nutzung des *Limulus Amoebocyte Lysate* (LAL)-Reagenzes (Bang, 1956). Dafür wurde ein Kit von GenScript gemäß Herstellervorgaben angewendet (Jeong et al., 2014). Die Detektion beruht auf der Verwendung eines modifizierten LAL-Reagenzes und eines synthetischen, chromogenen Substrats. Die Farbreaktion ermöglicht die Detektion von Endotoxin im Konzentrationsbereich von 0,01 EU/ml – 1,0 EU/ml. Für den Test wurden je 100 µl Endotoxin-Standard (0,01 – 1 EU/ml) oder Probe in Endotoxin-freien Reaktionsgefäßen vorgelegt. Der pH-Wert der Proben wurde getestet und bei Abweichung mit NaOH oder HCl auf pH7 eingestellt. Dann wurde je 100 µl LAL-Reagenz zugegeben, gut durchmischt und für 6 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 500 µl Stop-Lösung und *Color-Stabilizer* (#2 und #3) gestoppt und die Absorption der Proben gegen die Eichreihe bei 545 nm vermessen. Die Berechnung des Endotoxingehalts der Elutionsfraktionen erfolgte über die ermittelte Absorption anhand der linearen Regression der Eichgerade.

3.2.4.8. Entfernung von Endotoxin aus Proteineluaten

Die Entfernung von Endotoxin aus den Proteineluaten erfolgte unter Verwendung eines Säulen-basierten Systems (Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin; 0.25 ml Säule). Die Säulen enthalten Cellulose-Partikel, deren Oberfläche mit ε-Poly-L-Lysin beschichtet ist, an das Endotoxin mit hoher Affinität bindet. Die Entfernungszugabe wurde gemäß Herstellervorgaben durchgeführt. Dazu wurde zunächst der Lagerungspuffer durch Zentrifugation bei 500 g, 1 min aus der Säule entfernt, das Säulenmaterial mit 5 Säulenbettvolumen (2 ml) 0,2 M NaOH gewaschen und anschließend über Nacht in 0,2 M inkubiert. Am Folgetag wurde die NaOH durch Zentrifugation bei 500 g, 1 min entfernt, die Säule dann mit je 5 Säulenbettvolumen 2 M NaCl und nachfolgend endotoxinfreiem Wasser gewaschen und dann mit 5 Säulenvolumen PPX-Puffer equilibriert. Die Probe wurde nachfolgend auf das Säulenbett gegeben, die Säule verschlossen und für 1 h unter über Kopf Rotation bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Säule geöffnet, der Durchfluss gesammelt und der verbliebene Rest der gereinigten Probe durch Zentrifugation bei 500 g für 1 min eluiert. Danach wurde die Säule durch Inkubation in 0.2 M NaOH über Nacht regeneriert und bis zur nächsten Verwendung in 20 % (v/v) Ethanol gelagert.

3.2.4.9. Western Blot

Für den Western Blot, wurden die auf das Zielprotein zu untersuchenden Proteinproben zunächst über SDS-PAGE nach Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel entnommen und mit Western Blot Transferpuffer (20 % (v/v) Methanol, 25 mM Tris, 192 mM Glycin) dreimal gewaschen. Ein Stapel aus mit Transferpuffer getränktem Filterpapier und einer zuvor mit Methanol für 1 min aktivierte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurde in der Blot-Apparatur aufgebaut. Dann wurde das gewaschene Gel

sorgfältig aufgelegt, glattgestrichen und mit einem weiteren getränkten Filterpapier abgedeckt. Eventuelle Luftblasen wurden durch sanften Druck und Glattstreichen entfernt. Die so präparierte Blot-Vorrichtung wurde in die mit vorgekühltem Transferpuffer gefüllte Kammer eingesetzt und mit einem vorgekühlten Kühlakku und Rührstab bestückt. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei 100 V für 60 min. Der Puffer wurde dabei zur besseren Wärmeverteilung bei 500 U/min gerührt. Anschließend wurde die Membran entnommen und der Transfer durch kurze Färbung mit Ponceau S-Lösung (0,1 % (w/v) Ponceau S, 1 % v/v Essigsäure) überprüft. Die Membran wurde dazu mit Ponceau S-Lösung benetzt und dann mehrmals bis zu Entfärbung mit Wasser gewaschen. Während des Prozesses werden Proteinbanden durch rote Färbung sichtbar. Bei erfolgreichem Transfer wurde die Membran mit Blockpuffer (5 % Magermilchpulver in TBST) für 60 min bei Raumtemperatur unter Schütteln bei 60 U/min geblockt. Die geblockte Membran wurde anschließend über Nacht bei 4 °C unter Schütteln mit dem in Blockpuffer vorverdünnten Primärantikörper, inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran dreimal für je 10 min unter Schütteln bei 60 U/min mit TBST gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem gegen den Erstantikörper gerichteten, HRP-markierten Sekundärantikörper unter Schütteln bei 60 U/min für 90 min bei Raumtemperatur. Die Membran wurde abschließend zweimal mit TBST und dann einmal mit TBS gewaschen. Die Detektion der HRP-markierten Antikörpermarkierten Banden erfolgte mittels ECL-Reagenz unter Messung des resultierenden Lumineszenzsignals.

3.2.5. Durchflusszytometrie

3.2.5.1. Herstellung einer Einzelzellsuspension der Milz

Für die Gewinnung der Einzelzellsuspensionen wurden die Mäuse zunächst durch Kohlenstoffdioxidexposition getötet, das Peritoneum desinfiziert, mit einer Schere eröffnet und die Milz stumpf heraus präpariert. Das Organ wurde sorgfältig von etwaigem Fettgewebe befreit und in RPMI-Medium überführt. Unter sterilen Bedingungen wurde das Organ mehrmals in sterilem Medium gewaschen und dann mithilfe eines Spritzenkolbens durch ein angefeuchtetes 100 µm Zellsieb gedrückt. Das Zellsieb und der Spritzenkolben wurden mit Medium gut nachgespült, die Zellen durch Zentrifugation bei 750 g sedimentiert und mit Medium gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Erythrozytenlysepuffer zugegeben, die Zellen resuspendiert und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Lyse durch Zugabe von 9 ml Medium gestoppt. Die Zellen wurden durch erneute Zentrifugation sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen für die Stimulation in Makrophagenmedium (RPMI mit 0,1 % (w/v) BSA, 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung) gründlich resuspendiert. Die Zelldichte wurde mittels Zählkammer bestimmt und die Zellen für die Stimulation auf eine Dichte von $1 \cdot 10^6$ /ml eingestellt.

3.2.5.2. Färbung gegen Oberflächenantigene

Für die Makrophagenfärbungen wurden jeweils $5 \cdot 10^5$ Zellen in *low-attachment* 24-well Platten unter sterilen Bedingungen mit entsprechenden Agonisten stimuliert und anschließend für die Färbung eingesetzt. Für die Evaluierung von Zellpopulationen der Milz oder Lavage wurden mindestens $1 \cdot 10^6$ Zellen eingesetzt, um auch kleine Zellpopulationen ausreichend repräsentieren zu können. Für die Färbung wurden die Zellen unter Pipettieren entweder aus der 24-well Platte gelöst und in eine 96-well Platte mit V-Boden überführt, beziehungsweise das nach Auszählen der Zellen in Lavage oder Splenozytensuspension ermittelte Volumen Suspension in eine 96-well Platte überführt. Die Zellen wurden nachfolgend bei 750 g für 5 min bei 4 °C sedimentiert und mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte zunächst der FcR-Block (Trustain, 1:50 Verdünnung) für 15 min bei

4 °C, bevor fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen die spezifischen Oberflächenantigene in ihrer jeweils zuvor titrierten, optimalen Verdünnung zugegeben wurden. Die Färbung erfolgte für 20 min bei 4 °C im Dunklen, bevor die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und in FACS-Puffer mit 4 % (v/v) Formaldehyd für 20 min bei 4 °C fixiert wurden. Danach wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und für die FACS-Messung in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und im Dunklen bei 4 °C gelagert. Zur absoluten Quantifizierung der Zellen wurden, falls erforderlich, vor der Messung je 20 µl frisch resuspendierter 123count eBeads zugegeben.

3.2.5.3. Intrazelluläre Färbung für die Durchflusszytometrie

Für die Evaluation der iNOS-Expression wurde eine intrazelluläre Färbung durchgeführt. Dafür wurden stimulierte BMDM zunächst mit FACS-Puffer gewaschen und die Oberflächenfärbung durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl Fixierungs-/Permeabilisierungspuffer für 20 min bei 4 °C fixiert und anschließend zweimalig mit Permeabilisierungs-/Waschpuffer gewaschen. Die Zellen wurden in 50 µl Permeabilisierungs-/Waschpuffer aufgenommen und mit der zuvor titrierten Menge iNOS-Antikörper versetzt (finale Verdünnung 1:400). Die Färbung erfolgte bei 4 °C für 20 min im Dunklen, bevor die Zellen bei 700 x g sedimentiert und zweimalig mit Permeabilisierungs-/Waschpuffer gewaschen worden. Die Zellen wurden erneut durch Zentrifugation sedimentiert und dann für die Messung in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen.

3.2.5.4. Phosflow Färbung zur Evaluierung des Phosphorylierungsstatus von Signalmolekülen

Für die Phosflow-Färbung wurden Maussplenozyten eingesetzt. Dafür wurden zunächst Milzen der zu untersuchenden Tiere isoliert und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Je nach Anwendung oder Kontrolle wurden die Splenozyten unter sterilen Bedingungen gehandhabt und mit entsprechenden Agonisten (IFN- γ ; IL-6; IL-4), die zur Aktivierung der STAT-Signalwege führen, für 45 min stimuliert. Für die Färbung und Stimulation wurden dabei jeweils 1×10^6 Zellen eingesetzt. Nachfolgend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1000 x g für 3 min bei 4 °C sedimentiert in BD Phosflow Perm Buffer III aufgenommen und über Nacht bei -20 °C fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und in 50 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die gegen Oberflächenantigene (TCR β -Kette, CD4, CD8 CD19, NK1.1) und phospho-STAT gerichteten Antikörper wurden in der entsprechend titrierten Verdünnung zugegeben, die Ansätze durch Pipettieren gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Als Kontrolle wurden jeweils unstimulierte Zellen genutzt. Nach der Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert, zweimalig mit FACS-Puffer gewaschen und für die Probenmessung in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen.

3.2.5.5. PrimeFlow RNA-Färbung

Die PrimeFlow-Methode ermöglicht die Färbung intrazellulärer RNA-Transkripte. Durch eine vorgeschaltete Antikörperfärbung auf zelltypspezifische Oberflächenmarker lässt sich somit die Expression eines Zielgens in einer bestimmten Zellpopulation evaluieren. Die Methode basiert auf der Hybridisierung spezifischer, komplementärer Sondenpaare an die Ziel-mRNA. Die verwendeten Sonden tragen Bindungsstellen, an die Vorverstärker- und nachfolgend Verstärkermoleküle hybridisieren können. An dieses Molekülgerüst aus RNA, Sonden, Vorverstärker und Verstärker bindet in einem abschließenden Schritt eine fluoreszenzmarkierte Sonde und ermöglicht so die Detektion der mRNA im FACS.

Die PrimeFlow-Färbung wurde nach Herstelleranleitung durchgeführt. Es wurden 1×10^6 bis maximal 5×10^6 Zellen pro Reaktion eingesetzt. Zunächst wurden die Zellen in FACS-Färbungspuffer gewaschen, in diesem resuspendiert und dann in gleicher Dichte in eine 96-well-Platte überführt. Nachfolgend wurden die Fc-Rezeptoren für 20 min auf Eis mit TruStain FcR-Block (Trustain, 1:50 verdünnt) geblockt, bevor für 25 min gegen ausgewählte Oberflächenantigene gefärbt wurde. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 600 g, 4 °C für 3 min sedimentiert und zweimal mit FACS-Färbungspuffer gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 200 µl Fixierungspuffer I für 30 min bei 4 °C fixiert, mit *RNA Permeabilization* Puffer und RNase-Inhibitor zweimal gewaschen und anschließend noch einmal mit RNA Fixierungspuffer II für 60 min bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit RNA Waschpuffer zweimal gewaschen und in 100 µl Waschpuffer resuspendiert. Dann wurde die Zielsonde hybridisiert. Dafür wurde der Zielsonden-Diluent auf 40 °C vorgewärmt, die Sonde 1:20 darin verdünnt und 100 µl der verdünnten Sonde zur Zellsuspension gegeben und gut durchmischt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 40 °C im Wärmeschrank inkubiert, die Zellen durch Zentrifugation bei 1000g, 4 °C für 3 min sedimentiert und zwei Mal mit RNA Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut in 100 µl Waschpuffer mit RNase Inhibitor resuspendiert und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am Folgetag wurde die Signal-Amplifikation durchgeführt. Dafür wurde der *PreAmp-Mix* auf 40 °C vorgewärmt und die Zellsuspension mit 100 µl PreAmp-Mix versetzt, gut durchmischt und für 2 h bei 40 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert, zweimal gewaschen und erneut in 100 µl Waschpuffer resuspendiert, dann wurden 100 µl des auf 40 °C vorgewärmten Amplifikationsmixes zugegeben, gut durchmischt und für weitere 2 h bei 40 °C inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen sedimentiert, zweifach mit RNA-Waschpuffer gewaschen und in 100 µl Waschpuffer aufgenommen. Dann wurden 100 µl der 1:100 in *Label Probe Diluent* verdünnten Label-Probe zugegeben, gemischt und für 1 h bei 40 °C inkubiert. Abschließend wurde zweifach mit RNA-Waschpuffer gewaschen und die Zellen bis zur Messung in FACS-Puffer gelagert.

3.2.5.6. FACS-Messung

Die Messung der gefärbten Zellsuspensionen erfolgte am BD FACS Canto unter Verwendung von FACS Diva-Software. Anhand der ungefärbten Kontrolle wurden die Zellen über Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreuung (SSC) identifiziert und zudem über FSC-H und FSC-A auf Einzelzellen vorgegattet. Anhand der ungefärbten und Einzelkanalkontrollen wurden die Verstärkungsspannungen für die einzelnen Fluorophore per Histogramm optimal eingestellt. Über die entsprechenden Isotypkontrollen wurden die Hauptzellpopulationen identifiziert und graphisch für die optische Verfolgung während der Probenmessung gegenübergestellt. Je Bedingung wurden mindestens 5×10^5 Zellen aufgenommen. Zur absoluten Quantifizierung mittels Zählpartikeln wurden auch die Zählpartikel über Vorwärtsstreuung und FITC-Fluoreszenz identifiziert. Nach Beendigung der Probenmessung und Aufnahme der Kompensationsproben (Einzelfärbungen und ungefärbte Kontrolle) wurden die Daten aus FACS-Diva exportiert und über die Software FlowJo ausgewertet. Die Berechnung absoluter Zellzahlen über zugegebene Zählpartikel erfolgte anhand der Gleichung (1):

$$Zellzahl_{abs} = \frac{n_{Zelltyp} \cdot V_{eBead}}{V_{sus} \cdot n_{eBeads}} \quad (1)$$

Wobei $n_{Zelltyp}$ die Anzahl der Zellen eines Zelltyps, V_{eBead} dem zugegebenen Volumen Zählpartikel, V_{sus} dem Volumen der Zellsuspension und n_{eBeads} der Anzahl der detektierten Zählpartikel entspricht.

3.2.6. Zellkulturtechniken

3.2.6.1. Kryokonservierung von Zellkulturlinien und Knochenmarkszellen

Zur Konservierung von Zellkulturlinien wurden die Zellen zunächst bis zur Konfluenz in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Ablösung adhärenter Zellen erfolgte durch Trypsinbehandlung für maximal 5 min bei 37 °C, bevor die Reaktion durch Zugabe von L-Zell-Medium abgestoppt wurde. Für die Kryokonservierung wurden die in L-Zell-Medium aufgenommenen Zellen gezählt und in einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/500 μ l in einem Kryoröhrchen vorgelegt, dann wurden 500 μ l Kryomedium (80 % FBS, 20 % DMSO) zugegeben und gründlich durchmischt. Für die Kryokonservierung muriner Knochenmarkszellen wurde analog verfahren. Mäuse wurden dazu durch Kohlenstoffdioxidexposition getötet, Tibia und Femur isoliert und unter sterilen Bedingungen nach kurzer Desinfektion eröffnet und mit RPMI-Medium gespült. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 750 g für 5 min sedimentiert, in L-Zell-Medium aufgenommen und wie zuvor mit Kryomedium versetzt. Das Einfrieren erfolgte bei -80 °C unter Verwendung eines mit Isopräonal gefüllten Kryogefäßes. Am Folgetag wurden die Kryoröhrchen der dauerhaften Lagerung über Flüssigstickstoff zugeführt.

3.2.6.2. Herstellung von L-Zell-Überstand

Für die Herstellung des L-Zell-Überstandes wurden kryokonservierte L929-Zellen zunächst bei 37 °C angetaut und zur Verdünnung des DMSO unmittelbar in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit RPMI aufgefüllt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 750 g für 5 min sedimentiert und dann in L-Zell-Medium aufgenommen. Die gesamte, gründlich resuspendierte Zellsuspension wurde in eine 75 cm²-Zellkulturflasche überführt und bis zur Konfluenz bei 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ und 96 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen durch Trypsinverdau abgelöst, die Reaktion durch Zugabe von L-Zell-Medium abgestoppt und die Zellen in gleichmäßiger Dichte in die 182,5 cm²-Produktionsflaschen überführt. Die Produktion erfolgte für die Dauer einer Woche bei 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ und 96 % relativer Luftfeuchtigkeit, bevor der Überstand abgenommen, steril filtriert und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert wurde.

3.2.6.3. Bestimmung der Gesamtzellzahl für *in vitro* Experimente

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer *improved* Zählkammer unter Trypanblau-Ausschluss bestimmt. Dafür wurde die Zellsuspension je nach zu erwartender Zelldichte 1:10 bis 1:20 in 0,4% (w/v) Trypanblaulösung verdünnt und auf die Zählkammer ausgebracht. Anschließend wurden die vier Eckquadrate der Zählkammer in Doppelbestimmung ausgezählt. Die Zahl der Gesamtzellen, $n_{\text{Gesamtzellen}}$, lässt sich anhand der gezählten Zellen, $n_{\text{gezählt}}$, gemäß Gleichung (2) berechnen:

$$n_{\text{Gesamtzellen}} = n_{\text{gezählt}} \cdot f \cdot 10^4 \cdot V_{\text{gesamt}} \quad (2)$$

Hierbei gibt f den Verdünnungsfaktor und V_{gesamt} das Gesamtvolumen der Suspension an.

3.2.6.4. *In vitro* Stimulation und Probennahme

Die per Zählkammer ausgezählten BMDM-Zellen wurden, sofern im Ergebnisteil nicht anders angegeben, in 24-well Zellkulturplatten mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen in 1 ml Makrophagenmedium ausplattiert. Vor der Stimulation wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ und 96 % relativer Luftfeuchtigkeit adhären gelassen. Dann erfolgte die Stimulation mit den entsprechenden Agonisten in ihrer jeweiligen Zielkonzentration. Für

FACS-Färbungen wurden die Zellen in äquivalenter Dichte in zellabweisende 24-well Platten ausplattiert, um die Zellgewinnung nach Stimulation zu erleichtern.

Nach Erreichen des jeweiligen Endpunkts wurden die Proben in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 600 g, 4 °C zentrifugiert, um etwaige Zellen zu sedimentieren. Danach wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert. Im Fall der FACS-Färbung wurden die Zellen in der Platte durch Pipettieren gut resuspendiert, die Suspension bei 600 g, 4 °C für 5 min zentrifugiert und die sedimentierten Zellen nach Entfernung des Überstands für die Färbung eingesetzt.

3.2.7. Funktionelle Tests

3.2.7.1. Griess Test

Zur indirekten Bestimmung der iNOS-Aktivität (Synthese von NO) wurden die Konzentrationen von Nitrit, das stabile Oxidationsprodukt von NO unter oxidierenden Bedingungen, mittels Griess Test bestimmt. Der Test wurde in einer 96-well Mikrotiterplatte durchgeführt. Dazu wurden pro Probe 10 µl Griess-Reagenz mit 75 µl Probe vermischt und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 150 µl gebracht. Die absoluten Werte wurden durch eine seriell verdünnte Standardreihe mit bekannten Nitritkonzentrationen bestimmt. Die Reaktionen wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Absorption bei 550 nm fotometrisch bestimmt.

3.2.7.2. BIOMOL Green Assay

Das BIOMOL Green Assay wurde zur Bestimmung der Phosphatkonzentration genutzt. Es basiert auf der Detektion von Phosphat durch eine colorimetrische Reaktion mit Malachitgrün (Carter & Karl, 1982; Feng et al., 2011; Itaya & Ui, 1966; Penney, 1976; Petitou et al., 1978). Der Test wurde im Mikrotiterplatten-Format durchgeführt. Dazu wurden jeweils 50 µl Probe oder Phosphat-Standard in Doppelbestimmung vorgelegt und mit 100 µl BIOMOL Green Lösung versetzt. Die Platte wurde anschließend für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei 620 nm fotometrisch gemessen. Anhand der Eichgerade mit bekannten Phosphatkonzentrationen wurden anschließend die absoluten Phosphatkonzentrationen der Proben rechnerisch anhand einer linearen Regression bestimmt.

3.2.7.3. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

ELISA wurden gemäß Herstellervorgabe durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben wurden die ELISA-Kits von der Firma BioLegend bezogen und funktionieren nach dem *Sandwich*-Prinzip, wobei ein erster Antikörper an die Platte und das Antigen bindet und es dadurch immobilisiert. Das immobilisierte Antigen wird anschließend durch einen zweiten Antikörper detektiert. Die ELISA-Platten wurden dazu über Nacht mit dem *coating*-Antikörper in seiner jeweiligen Arbeitskonzentration inkubiert. Am Folgetag wurde die ungebundene Fraktion durch dreimaliges Waschen mit PBST (0,05 % v/v TWEEN20) entfernt und anschließend unspezifische Bindungsstellen durch Blocken mit BSA-Lösung abgesättigt. Dann wurden die Proben jeweils in technischen Duplikaten in die Platte pipettiert. Der ELISA wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bevor erneut gewaschen wurde und der Biotin-gelabelte Detektionsantikörper zugegeben wurde. Die Platte wurde bei Raumtemperatur für weitere zwei Stunden inkubiert. Dann wurde gewaschen und durch Zugabe von Streptavidin-HRP der Detektionskomplex gebildet. Die Entwicklung erfolgte durch Zugabe chromogenen Substrats, wobei die Farbreaktion nach etwa 10 min bei ausreichender Entwicklung durch Zugabe von 2N Schwefelsäure

abgestoppt wurde. Die Absorption wurde fotometrisch bei 550 nm gemessen. Die Bestimmung der absoluten Konzentrationen erfolgte anhand einer Eichreihe bekannter Konzentrationen des jeweils zu messenden Cytokins unter Verwendung einer sigmoidalen Kurvenanpassung.

3.2.7.4. pHrodo™ Phagocytosetest

Der pHrodo-Test wurde mit pHrodo Green-markierten *E. coli* durchgeführt. Dafür wurden murine BMDM in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/100 μ l in einer schwarzen 96-well Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂, 95 % relative Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die pHrodo-Suspension hergestellt, indem die Partikel in 2 ml HBSS in einer finalen Konzentration von 1 mg/ml aufgenommen und gründlich resuspendiert wurden. Zur verbesserten Durchmischung wurde die Suspension zudem für 5 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad behandelt und anschließend erneut durch Vortexen gemischt. Die in der Mikrotiterplatte vorgelegten Zellen wurden mit je 50 μ l der pHrodo *E. coli*-Suspension versetzt (finale Konzentration 333 μ M) und die Fluoreszenz für vier Stunden bei 37 °C verfolgt. Die Messung erfolgte im Abstand von jeweils 2 min bei Anregung mit 509 nm und Aufnahme der Emission bei 533 nm. Die Messhöhe wurde auf 1 mm oberhalb der Platte eingestellt.

3.2.7.5 Zelluläres Überleben unter aziden Bedingungen

Für die Überlebensstudien in azidem Medium wurden BMDM für eine Woche *in vitro* differenziert, die Zellen abgelöst, in der Neubauer-Zählkammer ausgesät und in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml in einer 24-well Platte in Azidmedium (pH5,5) beziehungsweise als Kontrolle in Neutralmedium (pH7,2) ausgesät. Die Zellen wurden unter diesen Bedingungen für 24 h und 48 h inkubiert, bevor sie für die FACS-Färbung eingesetzt wurden.

3.2.8. Statische Auswertung

Die hier präsentierten Daten resultieren aus der Auswertung von mindestens 3, unabhängig durchgeführten Experimenten. ELISA-basierte Cytokinbestimmungen und RNA-Quantifizierungen wurden unter Nutzung technischer und biologischer Duplikate durchgeführt. Die Daten wurden unter Angabe von Mittelwert und Standardfehler (S.E.M) präsentiert. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch GraphPad Prism 8. Sepsis-Überlebensstudien wurden durch den Mantel Cox Logrank –Test ausgewertet. Vergleiche zwischen mehreren (> 2) experimentellen Gruppen erfolgten durch zweiseitige ANOVA. Untersuchung lediglich zweier experimentellen Gruppen bezüglich signifikanter Abweichungen erfolgten mittels Student's t-Test unter Annahme einer Normalverteilung. Signifikanzniveaus wurden in den Graphen durch Sterne nach folgender Konvention anhand der p-Werte sichtbar gemacht: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, n.s.: p>0.05.

3.2.9 Bioinformatik: Genutzte Software und Datenbanken

Für die Auswertung der ELSA-Daten wurde die Revelation Software (Version G3.2) von Dynex Technologies® verwendet. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mittels FlowJO (Version 10.5.2). Die qPCR-Analysen wurden mittels der Software CFX Manager (Version 3.1) von Bio-Rad durchgeführt. Statistische Auswertungen und graphische Darstellungen erfolgten mittels GraphPad 8 von GraphPad Software Inc. Für die Erstellung der Abbildungen wurden Bausteine von somersault 18:24 (www.somersault1824.com) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1. L-PolyP

4.1.1 L-PolyP moduliert die Cytokinantwort *in vitro*

L-PolyP ist ein mikrobieller Metabolit, der primär der intrazellulären Energiespeicherung in Bakterien dient. Weitere Funktionen übernimmt er beispielsweise als Phosphatgruppendonator, Chelator von Kationen und als Pathogenizitätsfaktor in einigen pro- und eukaryotischen Krankheitserregern (Wang et al., 2018). Im Folgenden wurde der Einfluss von L-PolyP auf die durch mikrobielle Oberflächenstrukturen in Makrophagen induzierte Immunantwort untersucht (Abb. 7). *In vitro* wurden dafür BMDM mit verschiedenen TLR-Agonisten in Gegenwart beziehungsweise Abwesenheit von L-PolyP für jeweils 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Cytokinkonzentrationen im zellfreien Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Hierbei wurde eine signifikante Inhibition von LPS-, LTA-, Zymosan- und Peptidoglycan- induziertem IL-27(p28) durch L-PolyP beobachtet (Abb. 7A). Darüber hinaus wurde eine Modulation der PF4-Sekretion durch L-PolyP beobachtet. Hierbei erhöhte die Co-Stimulation mit L-PolyP signifikant die Sekretion dieses Chemokins nach Zymosan-, LPS-, LTA-, Peptidoglycan- und Mannan-Stimulation (Abb. 7B).

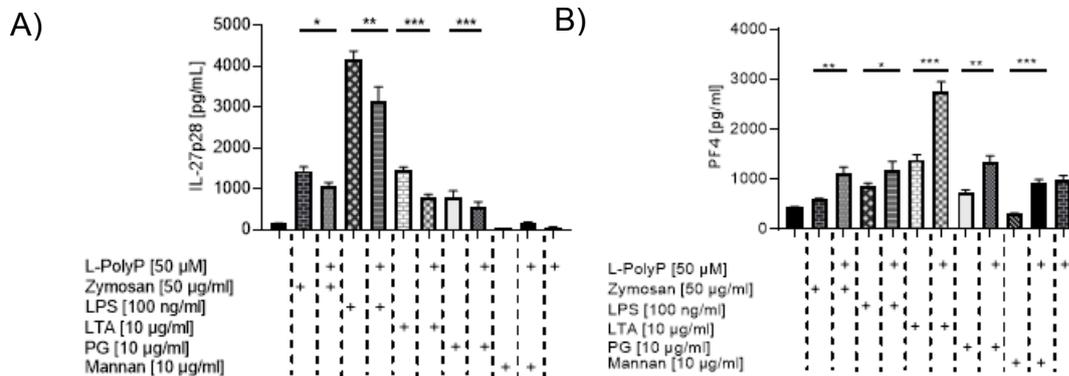


Abb. 7: Effekte von L-PolyP auf die durch verschiedene TLR-Agonisten induzierte Immunantwort. BMDM wurden *in vitro* mit verschiedenen Stimulantien aktiviert und mittels ELISA bezüglich IL-27(p28)-, PF4- und CXCL10-Sekretion nach 24 h untersucht. Der Effekt von L-PolyP auf die Cytokinsekretion wurde mittels Co-Stimulation untersucht. A) IL-27(p28) Sekretion. L-PolyP inhibierte signifikant die durch Zymosan, LPS, LTA und Peptidoglycan induzierte Sekretion von IL-27(p28). Für Mannan wurde hingegen keine signifikante Induktion von IL-27(p28) beobachtet, der Effekt scheint durch L-PolyP nicht moduliert. B) PF4-Freisetzung nach Stimulation. L-PolyP erhöhte signifikant die durch die Zymosan, LPS, LTA, Peptidoglycan induzierte PF4-Sekretion. Mannan hingegen hatte kaum Einfluss auf die PF4-Sekretion, während LTA den stärksten induktiven Effekt aufwies und die LTA-induzierte Sekretion am stärksten durch L-PolyP moduliert erschien. Statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA unter Angabe folgender Signifikanzniveaus: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, n.s.: $p > 0.05$.

L-PolyP: langkettiges Polyphosphat, LPS: Lipopolysaccharid, LTA: Lipoteichonsäure, PG: Peptidoglykan, IL-27: Interleukin-27, PF4: Platelet factor 4 (CXCL4), CXCL10: CXC Chemokine Ligand 10

4.1.2. L-PolyP moduliert die Antigenpräsentation und das inflammatorische Potenzial

Zusätzlich zum modulatorischen Effekt auf die Cytokinsekretion wurde im Folgenden auch der Effekt von L-PolyP auf die Antigenpräsentation in BMDM untersucht. Auf RNA-Ebene zeigte sich, dass LPS-induzierte TAP1-Expression nach Co-Stimulation mit L-PolyP signifikant reduziert ist (Abb. 8A). Dieses Molekül ist für die Beladung der MHC-I-Komplexe verantwortlich. Darüber hinaus ist die LPS-induzierte Expression von *Irg1* durch L-PolyP signifikant reguliert (Abb. 8B). *Irg1* codiert für das mitochondriale Enzym Aconitat-

Decarboxylase 1 (ACOD1), die unter inflammatorischen Bedingungen insbesondere in Säugetiermakrophagen induziert wird und die Produktion von Itakonat aus dem Zitratzyklusintermediat cis-Aconitat katalysiert. Itakonat wurde in der Literatur unter anderem mit einer antimikrobiellen Wirkung assoziiert (Luan & Medzhitov, 2016).

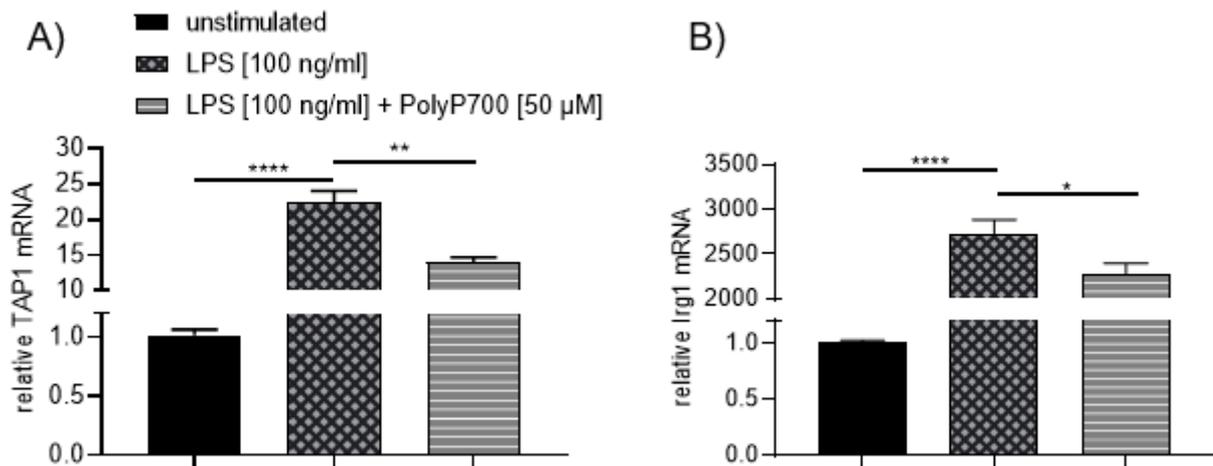


Abb. 8: L-PolyP moduliert Antigenpräsentation und Irg1-Induktion im BMDMs. A) L-PolyP reduzierte signifikant die LPS-induzierte *TAP1*-Genexpression. B) L-PolyP-Costimulation führte zu signifikanter Reduktion LPS-induzierter *Irg1* Expression. Dargestellt sind Daten von drei unabhängigen Experimenten unter Angabe von Mittelwert und Standardfehler. Untersucht wurden die Zellen jeweils nach zehnstündiger Stimulation. Für die statistische Analyse der Daten wurde eine ANOVA durchgeführt. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt angegeben: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, n.s.: $p > 0.05$.

TAP1: Transporter associated with antigen processing 1, H2-Eb: MHC-II Antigen, CD80/CD86: *Cluster of differentiation 80/86*, HIF1 α : *Hypoxia-inducible factor*, Irg1: *Immune-responsive gene 1*.

Aufgrund der signifikanten Regulation der *Irg1*-Expression auf RNA-Ebene wurde die Rolle von *Irg1*-Induktion in Makrophagen untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, dass LPS-Stimulation in Makrophagen zu vermehrter *Irg1*-Induktion und damit zu erhöhter Itaconat-Produktion führt (Strelko et al., 2011). Dabei wurde Itakonit insbesondere auch mit der Limitierung inflammatorischer Zellantworten und mit einer antimikrobiellen Wirkung assoziiert (Hooftmann & O'Neill, 2019; Mills et al., 2018). Im Folgenden wurde deshalb der Einfluss von Itaconat auf BMDM, insbesondere auch auf bereits in Richtung eines M1 (LPS, pro-inflammatorisch) beziehungsweise M2-Phänotyps (IL-4, anti-inflammatorisch) differenzierte Makrophagen, *in vitro* näher untersucht (Abb. 9) (Atri et al., 2018; Orecchioni et al., 2019).

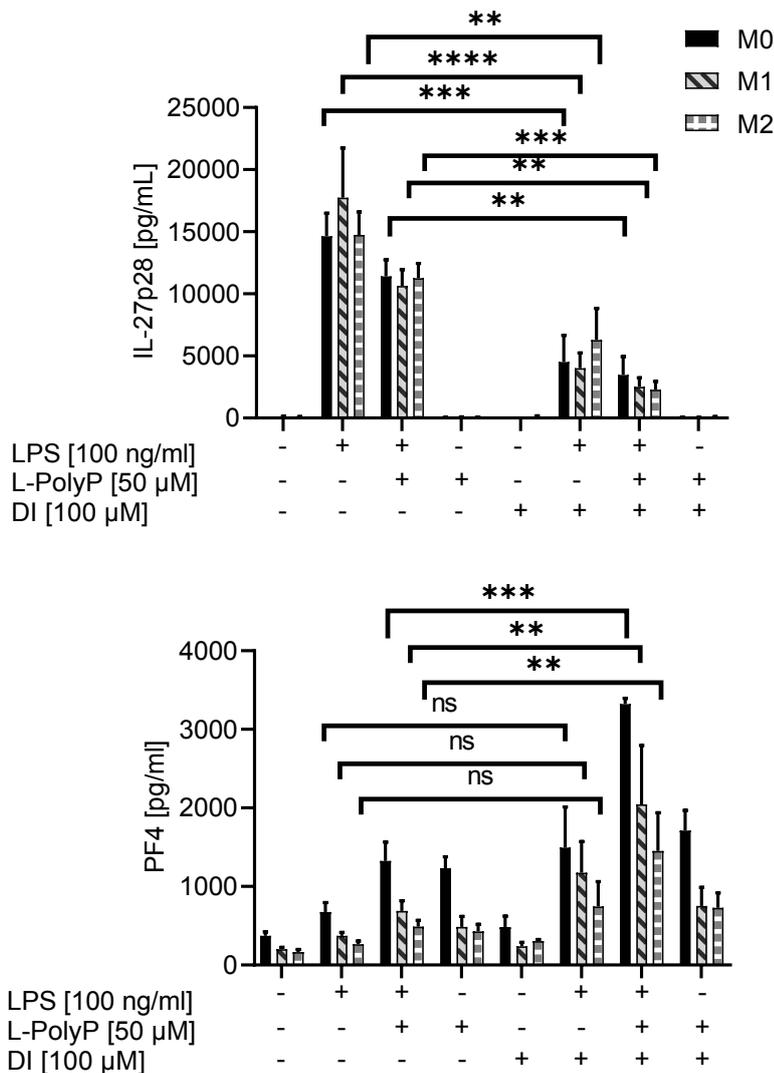


Abb. 9: Effekt von Dimethylitaconat auf differenzierte BMDM *in vitro*. BMDM wurden für 24 h mit LPS beziehungsweise IL-4 in Richtung M1- oder M2-Phänotyp differenziert. Auf diese Weise differenzierte BMDM wurden anschließend mit LPS und L-PolyP in Gegenwart, beziehungsweise Abwesenheit, von Dimethylitaconat für weitere 24 h stimuliert. Die Konzentration sekretierten IL-27p28 und PF4 wurde mittels ELISA im Zellkulturüberstand bestimmt. Dargestellt sind die Daten aus drei unabhängigen Experimenten unter Angabe des Mittelwerts und des Standardfehlers. Statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA. Signifikanzniveau: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, n.s.: $p > 0.05$.

DI: Dimethylitaconat, LPS: Lipopolysaccharid, LTA: Lipoteichonsäure, M0: unstimulierte BMDM, M1: mit LPS polarisierte BMDM, M2: mit IL-4 polarisierte BMDM

Wie aus Abb. 9 ersichtlich, inhibierte Itaconat im Vergleich zu nicht mit Itaconat behandelten Zellen, maßgeblich die LPS-induzierte IL-27p28 Sekretion. Der Effekt war für alle artifiziellen Makrophagenphänotypen (M1, M2) signifikant. Im Gegensatz dazu wurde die LPS-induzierte PF4-Sekretion in Gegenwart von Dimethylitaconat, gegenüber nicht mit Dimethylitaconat behandelten Zellen, verstärkt. Der Effekt ist für mit L-PolyP co-stimulierte Proben signifikant. Die alleinige Stimulation mit LPS beziehungsweise Dimethylitaconat war hingegen nicht ausreichend, um signifikante Unterschiede in der Konzentration an freigesetztem PF4 zu induzieren.

4.1.3. Inaktivierung von L-PolyP *in vivo* verbessert das Überleben im Rahmen polymikrobieller Sepsis

Aufgrund seiner modulatorischen Einflüsse auf Cytokinsekretion und Genexpression, wurde für L-PolyP eine Funktion als Pathogen-assoziiertes molekulares Muster postuliert, die im Folgenden weiter untersucht wurde. Aus der Literatur ist bekannt, dass L-PolyP in Prokaryoten intrazellulär durch das Enzym Exopolyphosphatase (PPX) degradiert wird. Das Enzym PPX1 der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde deshalb in *Eschericia coli* kloniert (überlassen durch M. Gray / U. Jakob, University of Michigan; Gray et al., 2014) und rekombinant hergestellt. Die Reinigung des Proteins aus dem Zelllysate erfolgte dabei über Affinitätschromatographie durch Bindung des His₆-getaggten Proteins an eine Nickel-Nitriltriessigsäure (Ni-NTA)-gekoppelte Säule. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte nachfolgend durch kompetitive Verdrängung aus der Bindung durch hohe Imidazolkonzentration (Abb. 10 A). Die gewonnenen Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE hinsichtlich ihrer Reinheit untersucht (Abb. 10 B) und der Proteingehalt nach der Bradford-Methode bestimmt. Die Aktivität der Hauptelutionsfraktion wurde mittels eines enzymatischen Tests und gekoppelter chromogener Reaktion getestet (Abb. 10 C). Zudem wurde der Effekt der rekombinanten PPX auch *in vitro* mit Hilfe von BMDM untersucht. Als Endpunkt wurde auch hier die Sekretion von IL-27(p28) nach Stimulation mit LPS und Co-Stimulation mit nativem und PPX-verdaulichem L-PolyP getestet (Abb. 11).

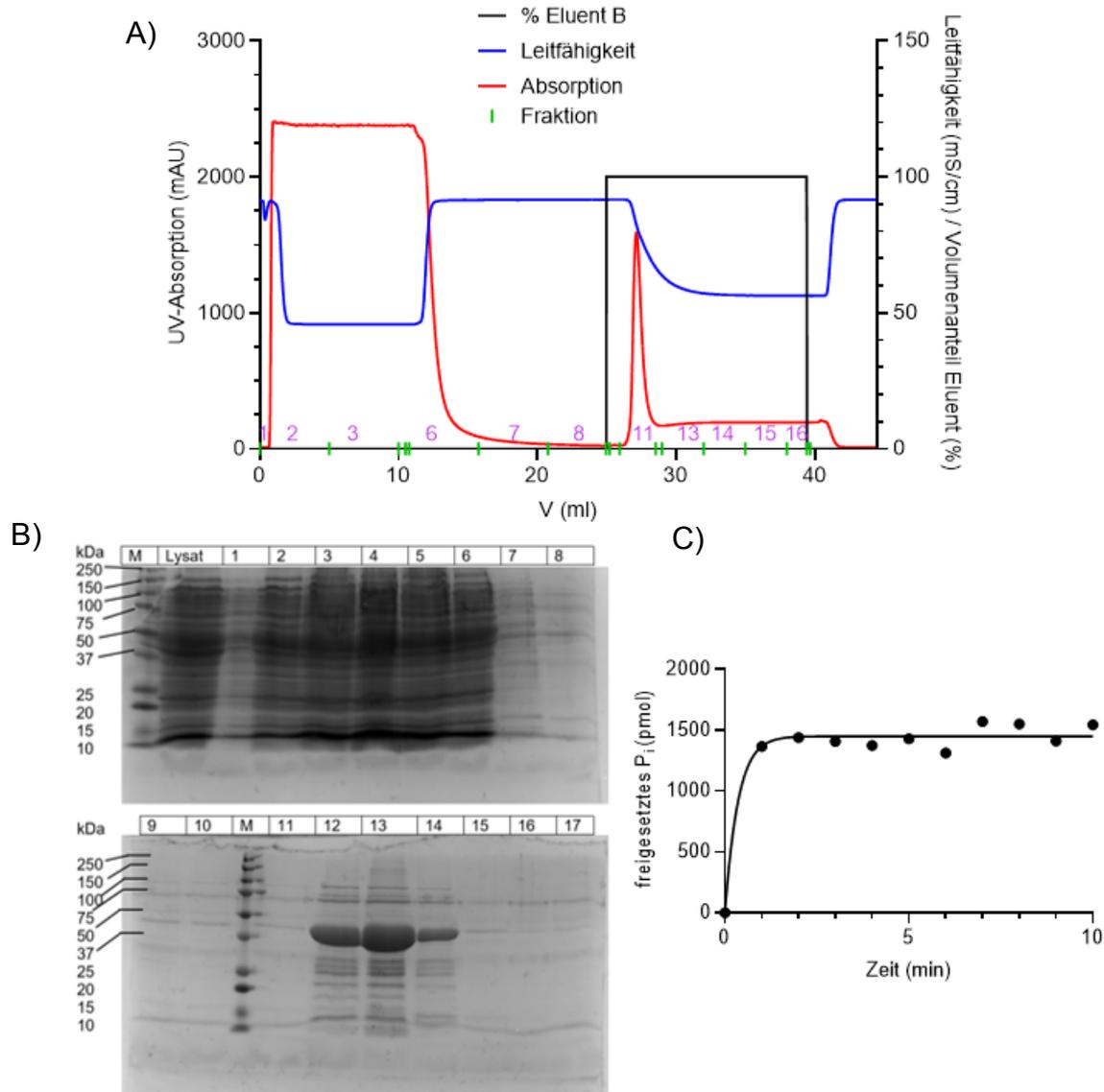


Abb. 10: Reinigung rekombinanter Exopolyphosphatase und Aktivitätstestung.

His₆-getaggte *Saccharomyces cerevisiae* Exopolyphosphatase (ScPPX) wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert und durch Affinitätschromatographie an Nickel-NTA aus dem aufgeschlossenen Zellsediment gereinigt. A) Chromatogramm des Säulenlaufs. Aufgetragen sind UV-Absorption, Leitfähigkeit und der Volumenanteil an Elutionspuffer gegen das Elutionsvolumen. Nach Fraktionierung des Säulendurchflusses und Sammlung der Waschfraktionen erfolgt eine isokratische Elution des gebundenen Proteins mit 500 mM Imidazol, entsprechend 100 % Volumenanteil an Eluent B. B) SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie unter isokratischer Elution mit Imidazol. Aufgetragen wurde der Überstand des Zelllysats, der Säulendurchfluss (Fraktionen 1 bis 3), die Waschfraktionen (Fraktionen 4 bis 9) und die Elutionsfraktionen (Fraktionen 10 – 17). Die denaturierten Proben wurden im 12 %-igen Trenngel bei 100 V für 90 min aufgetrennt und die Proteinbanden nach *Coomassie Blue*-Färbung detektiert. C) Enzymatischer Aktivitätstest der Hauptelutionsfraktion 12. L-PolyP wurde enzymatisch durch ScPPX verdaut und freigesetztes Monophosphat kolorimetrisch in Abhängigkeit von der Reaktionszeit detektiert. Die rechnerisch bestimmte Monophosphatkonzentration wurde gegen die Reaktionszeit aufgetragen.

kDa: Kilodalton, M: Marker, P_i: Monophosphateinheit, mAU: milli arbitrary units (Einheitenlos), V: Elutionsvolumen.

In der Affinitätschromatographie der rekombinanten ScPPX an Ni-NTA wurden drei Elutionsfraktionen (12-14) erhalten (Abb. 10). Die Fraktionen 13 und 14 wurden aufgrund

ihres geringen Volumens kombiniert und zusammen analysiert. Für die Fraktion 12 wurde eine Proteinkonzentration von 1,12 mg/ml und für die kombinierten Fraktionen 13 und 14 eine Konzentration von 0.71 mg/ml bestimmt. Die Gesamtausbeute an PPX in den Elutionsfraktionen beträgt somit etwa 3,7 mg. Die Aktivität wurde durch enzymatischen Umsatz von L-PolyP mit PPX und colorimetrischer Bestimmung des freigesetzten Monophosphats bestimmt. Für das Gemisch der Fraktionen 13 und 14 wurde eine Aktivität von 19,6 nmol/(min·mg PPX) ermittelt. Für die Fraktion 12 hingegen wurde eine etwas fünffach geringere Aktivität von 3,9 nmol/(min·mg PPX) erhalten. Für die *in vitro*-Testung der ScPPX-Aktivität wurde L-PolyP über Nacht mit dem Enzym vollständig verdaut. BMDM wurden mit LPS und verdautem beziehungsweise unverdautem L-PolyP für 24 Stunden stimuliert und dann die Konzentration sekretierten IL-27(p28) im zellfreien Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt (Abb. 11). Nach Verdau von L-PolyP war der zuvor beobachtete inhibitorische Effekt auf die LPS-induzierte IL-27-Sekretion aufgehoben.

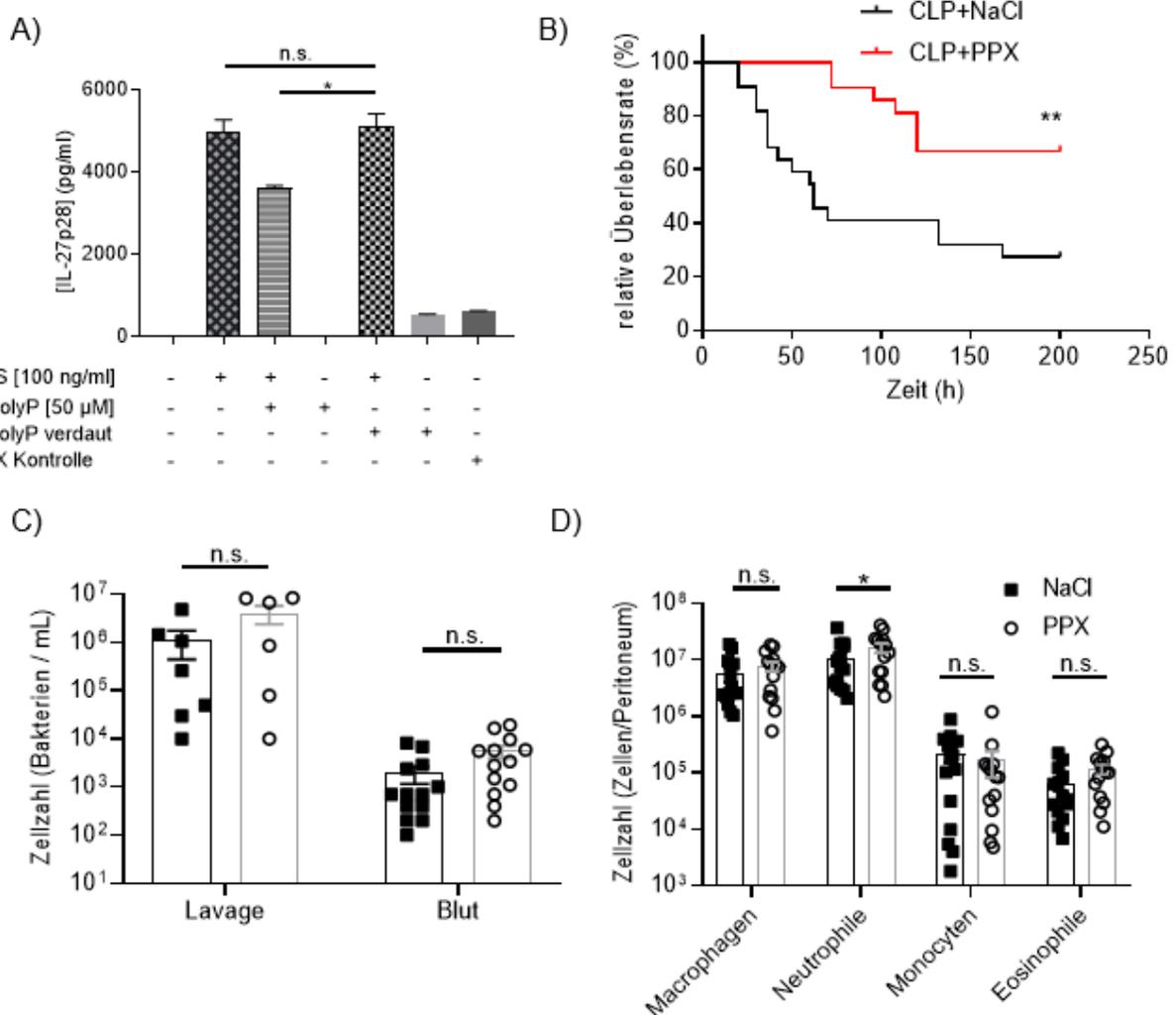


Abb. 11: *In vitro*- und *in vivo*-Effekt von PPX-Behandlung. A) *In vitro*-Testung der PPX-Aktivität mittels BMDM anhand der IL-27 Sekretion. BMDM wurden mit LPS und L-PolyP stimuliert und die Konzentrationen sekretierten IL-27p28 per ELISA bestimmt. Um die Aktivität der rekombinanten PPX zu testen, wurde zudem L-PolyP über Nacht enzymatisch verdaut. Anschließend wurde auch das verdauten L-PolyP für die Stimulation genutzt und mit unverdautem L-PolyP verglichen. Zur Kontrolle einer möglichen LPS-Kontamination der aus *E. coli* gewonnenen PPX wurde lediglich das Enzym allein getestet. Hier konnte lediglich eine sehr schwache Induktion von IL-27 beobachtet werden.

Fortsetzung Abb. 11:

B) Effekt der PPX-Behandlung auf das Überleben nach CLP-Sepsis. Männliche Tiere (n = 22 Tiere/Gruppe) des Wildtypstamms C57B6/JRj wurden der CLP-Operation zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis unterzogen. Der PPX-Gruppe wurden drei Stunden nach der Operation 60 µg PPX intraperitoneal verabreicht. Der Kontrollgruppe wurde NaCl verabreicht. C) KBU-Bestimmung in Peritoneallavage und Blut septischer Tiere. D) Zellzahlen eingewanderter Immunzellen im Peritoneum. Das Peritoneum septischer Tiere mit beziehungsweise ohne PPX-Behandlung wurde 48 h nach Induktion der Sepsis mittels CLP lavagiert und die Zellen über Durchflusszytometrie analysiert und quantifiziert. Dargestellt sind Daten von n = 14 Tieren pro Gruppe unter Angabe von Mittelwert und Standardfehler. Statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA. Dargestellt sind folgende Signifikanzniveaus: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, n.s.: p>0.05.

CLP: Caecum Ligatur und Punktion, LPS: Lipopolysaccharid, L-PolyP: langkettiges Polyphosphat, PPX: Exopolyphosphatase.

Nach der *in vitro*-Testung des rekombinanten Proteins wurde die Wirkung von ScPPX *in vivo* untersucht. Als Modell für eine polymikrobielle Sepsis wurde dabei die CLP (Caecum Ligatur und Punktion) genutzt. Der Schweregrad der CLP wurde auf etwa 50 % Mortalität in der Kontrollgruppe titriert. Der Kontrollgruppe wurde drei Stunden nach der Operation sterile Kochsalzlösung intraperitoneal (i.p.) appliziert. Der Untersuchungsgruppe wurden hingegen 60 µg sterile PPX i.p. appliziert. Während des Untersuchungszeitraums war die Letalität in der PPX-behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe einerseits signifikant reduziert (Abb. 11). Andererseits konnte festgestellt werden, dass mit PPX behandelte Tiere erst zu einem späteren Zeitpunkt verstarben als Tiere der Kontrollgruppe. Das Versterben behandelter Tiere setzte gegenüber der Kontrollgruppe erst deutlich verzögert nach ≥ 72 h ein.

4.2. MYADM

4.2.1. MYADM bindet L-PolyP und ist ein LPS-reguliertes Gen

MYADM wurde durch massenspektrometrische Analyse als L-PolyP-bindendes Protein identifiziert (Abb. 12). Seine Expression in BMDM und zelluläre Lokalisation in der Plasmamembran sowie eine starke Heraufregulation unter LPS-Stimulation mit einer weiteren Verstärkung der Expression unter Co-Stimulation mit L-PolyP machen es zu einem interessanten Kandidaten als zellulärer PolyP-Rezeptor und Modulator der LPS-vermittelten, angeborenen Immunantwort.

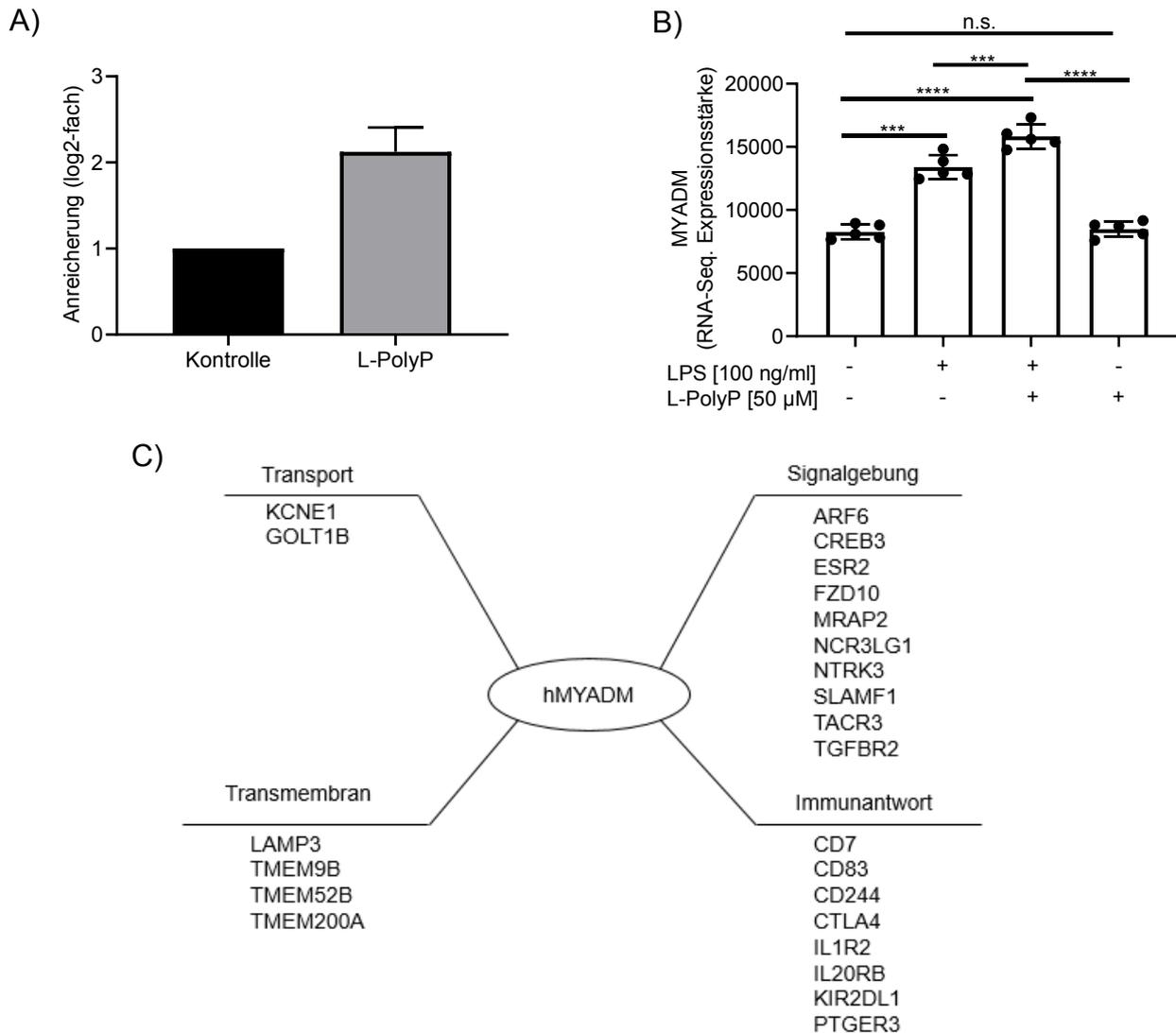


Abb. 12: Anreicherung von MYADM über L-PolyP-gekoppelte Mikropartikel sowie Expression von MYADM in BMDM und bekannte Interaktionspartner. A) Bindung von murinem MYADM an L-PolyP-gekoppelte Partikel. Gesamtzelllysate aus BMDM wurden hergestellt und mit L-PolyP-gekoppelten Partikeln inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden anschließend massenspektrometrisch identifiziert. MYADM wurde dabei durch L-PolyP im Vergleich zur ungekoppelten Kontrolle etwa doppelt so stark angereichert. Gezeigt sind die kombinierten Daten von n = 3 unabhängigen Experimenten unter Angabe von Mittelwert und Standardabweichung. Die gezeigten Daten wurden durch Auswertung bereits in unserer Gruppe vorhandener Massenspektrometrie-Daten erhalten.

Fortsetzung Abb. 12:

B) Die Expressionsstärke von MYADM in BMDM wurde mittels RNA-Seq auf Transkriptniveau analysiert. Hierbei zeigte sich unter LPS-Stimulation eine signifikante Heraufregulation von MYADM im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Unter Co-Stimulation mit L-PolyP ist der Effekt der Heraufregulation signifikant verstärkt. Stimulation mit L-PolyP allein zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die MYADM-Expression. Gezeigt sind Daten von $n = 5$ Tieren pro Gruppe unter Angabe des Mittelwerts und der Standardabweichung. Statistische Analyse erfolgte mittels gepaartem t-Test, Signifikanzniveaus: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, n.s.: $p > 0.05$. Die gezeigten Daten (A und B) resultieren aus der Analyse bereits in unserer Gruppe vorhandener Datensätze. C) Bekannte Interaktionspartner von humanem MYADM. Die Daten für murine Systeme sind bisher unvollständig. Eine Vielzahl der Interaktionspartner können den Funktionsbereichen der Signalgebung und Immunantwort zugeordnet werden. Zwei weitere Interaktoren können zellulären Transportprozessen zugeordnet werden. Vier Interaktoren, darunter drei Proteine der TMEM-Familie, können der Gruppe der Transmembranproteine zugeordnet werden (Breitkreuz et al., 2003; Huttlin et al., 2017).

ARF6: ADP-ribosylation factor 6, CD: *Cluster of differentiation*, CREB3: *CAMP Responsive Element Binding Protein 3*, CTLA-4: *Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*, ESR2: *Estrogen Receptor beta*, GOLT1B: Golgi Transport Protein 1B, IL1R2: Interleukin-1 Rezeptor 2, KCNE: *Potassium voltage-gated channel subfamily E member 1*, KIR2DL1: *Killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL1*, LAMP3: *Lysosomal associated membrane protein 3*, SLAMF1: *Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 1*, TACR3: Tachykinin Rezeptor 3, TGFBR2: *Transforming growth factor beta receptor 2*, TMEM: *Transmembrane protein*.

Darüber hinaus wurden für humanes MYADM eine Vielzahl molekularer Interaktionen mit Schlüsselproteinen aus Signalgebung (ARF6, TGF β R2) und Immunantwort (IL-1R2, CTLA-4) berichtet (Abb. 12 C). Auch Interaktionen mit Transmembranproteinen der TMEM-Familie und dem lysosomalen LAMP3 wurden beschrieben. Die Datenlage für murines MYADM ist derzeit unvollständig, weshalb hier stellvertretend Daten für humanes MYADM präsentiert wurden, die im Folgenden, zumindest teilweise, auch im murinen System verifiziert werden sollen.

4.2.2. MYADM^{-/-} Mäuse sind lebensfähig, fertil und zeigen keinen aberranten Phänotyp

MYADM wurde im Rahmen von Massenspektrometrie-gekoppelten Bindungsstudien mit L-PolyP-beschichteten Partikeln als L-PolyP-bindendes Protein identifiziert. Darüber hinaus zeigt sich auf Transkriptebene eine weitere Heraufregulation der Menge LPS-induzierter MYADM-Transkripte, während L-PolyP allein keinen signifikanten Effekt auf die MYADM-Expression zu haben scheint (Abb. 12). MYADM ist ein bekannter Interaktionspartner von IL1R2 und TGFBR2 (Breitkreuz et al., 2003; Huttlin et al., 2017), weshalb dieses Protein auch als immunologisches Target von Interesse ist.

Um die Funktion dieses Gens im immunologischen Kontext zu untersuchen, wurden MYADM-Knock-out-Tiere durch CRISPR-induzierte Mutagenese von Exon 3 des MYADM-Gens in Zygoten und anschließenden Transfer der editierten Blastocysten in scheinsschwangere C57BL6/J-Weibchen, generiert. Für die Mutagenese wurde ein gRNA-Paar mikroinjiziert, das, sollten beide Schnittstellen geschnitten werden, zu einer Deletion von 990 bp führen sollte (Abb. 1). Die Nachkommen wurden mittels PCR auf Mutationen in Exon 3 untersucht. Genomische DNA positiv typisierter Tiere wurde zudem hinsichtlich der genauen mutierten Sequenz nach dem Sanger-Verfahren sequenziert (Abb. 13). Positiv typisierte Tiere wurden mit C57BL6/J für vier Generationen zurückgekreuzt und dann zunächst heterozygot und anschließend homozygot verpaart. Die Rückkreuzung wurde durchgeführt, um das Risiko für das Vorhandensein von *off-target* Mutationen zu reduzieren.

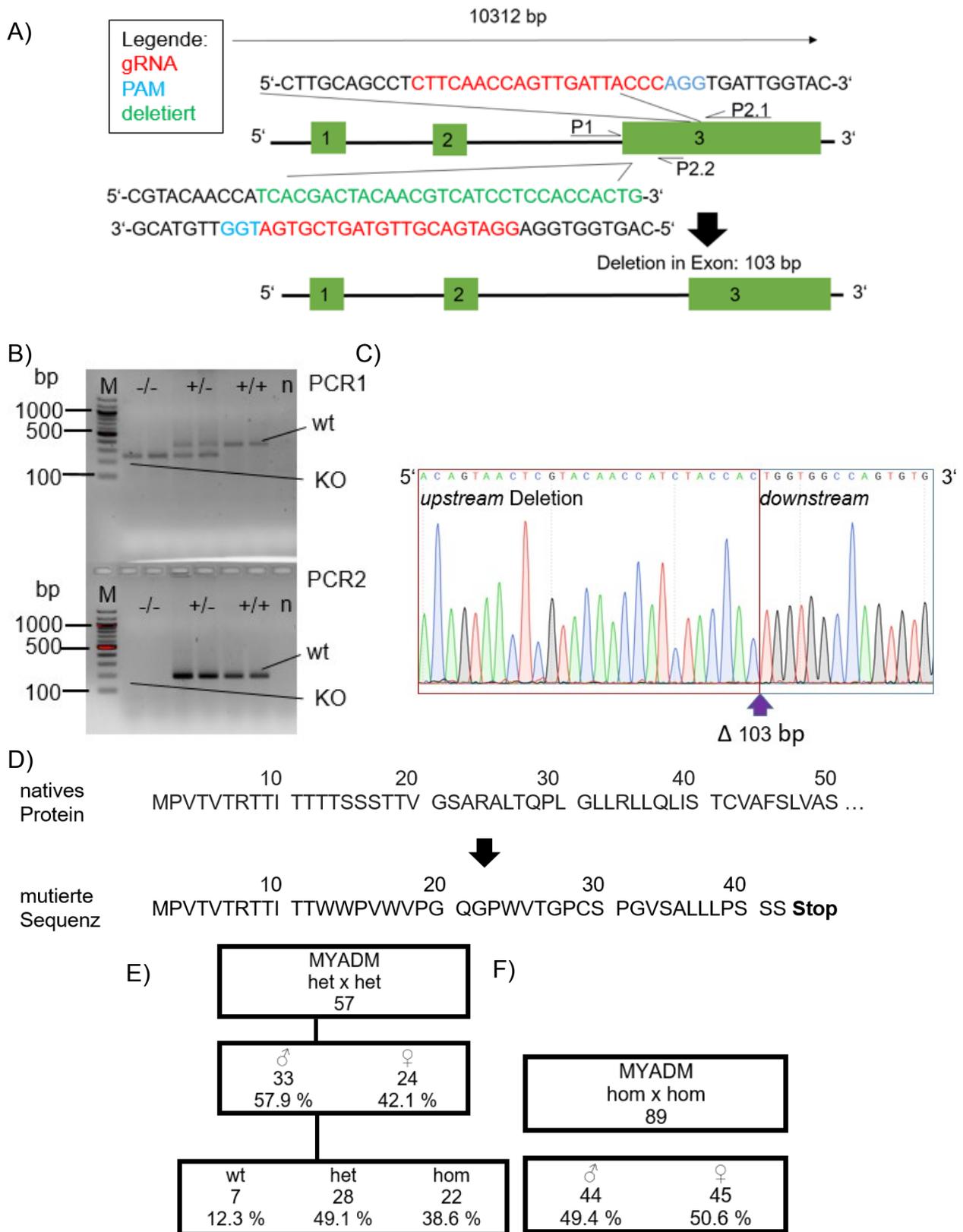


Abb. 13: CRISPR-Strategie, Genotypisierung, Sequenzierung und Zuchtstatistik für MYADM-Knock-out Mäuse. A) CRISPR-Mutagenese. Ein gRNA-Paar, das, im Falle einer Strangspaltung an beiden Schnittstellen, zu einer theoretischen Deletion von 990 bp in Exon3 des MYADM-Gens führen sollte, wurde in Zygoten mikroinjiziert. Die Blastozysten wurden in scheinchwangere Weibchen implantiert und die Nachkommen via PCR auf Genom-Editierung untersucht (B). Durch zwei separate PCR-Reaktionen können heterozygote, homozygote und Wildtyp-Tiere zweifelsfrei und robust unterschieden werden.

Fortsetzung Abb. 13:

C) Repräsentatives Chromatogramm der Sanger-Sequenzierung. Genomische DNA per PCR homozygot typisierter Tiere wurde aus Ohrstanzen-Material extrahiert und bezüglich einer Editierung in Exon3 des MYADM-Gens sequenziert. Das Chromatogramm zeigt den Bereich um die editierte Sequenz. Die Größe der detektierten Deletion beträgt 103 bp. D) Native und trunkierte Aminosäuresequenz des Myadm-Proteins. Wildtypsequenz sowie aus CRISPR-Editierung resultierende mutierte und aufgrund eines entstandenen Stop-Codons trunkierte Aminosäuresequenz. E) Statistik der heterozygoten MYADM-Zucht. Es wurde eine Geschlechtsverteilung von 58% Männchen und 42 % Weibchen erhalten. Unter den Nachkommen waren 49 % heterozygote, 39 % homozygote sowie 12 % als Wildtyp genotypisierte Tiere. F) Im Rahmen der homozygoten Verpaarung der Tiere wurden 49 % Männchen und 51 % Weibchen erhalten.

bp: Basenpaar(e), gRNA: *guide* RNA, het: heterozygot, hom: homozygot, KO: Knock-out, PAM: *Protospacer adjacent motif*, P: Primerbindungsstelle, wt: Wildtyp (C57BL6/J)

Im Rahmen der Zucht der neu generierten MYADM-Knock-out Mäuse wurde eine Statistik über die Geschlechts- und Genotypenverteilung der Nachkommen geführt. Für die heterozygote Verpaarung der Tiere ergab sich ein Anteil von 58 % männlichen und 42 % weiblichen Nachkommen. Unter den Nachkommen ergab sich eine Verteilung von 12 % Wildtyp-Tieren, sowie 49 % heterozygot und 39 % homozygot genotypisierten Tieren. Für die homozygote Verpaarung ergibt sich ein Geschlechtsverhältnis von 49 % männlichen und 51 % weiblichen Tieren. In Anbetracht dieser Zuchtergebnisse wurde der Stamm als lebensfähig und fertil bewertet.

Neben der Untersuchung der Zuchtfähigkeit wurden die Tiere auch auf einen körperlichen, hämatologischen und klinisch-chemischen Phänotyp untersucht. Dafür wurden zunächst die Körper- und Organgewichte von Tieren beider Geschlechter im Vergleich mit Wildtyp-Kontrollen gleichen Alters bestimmt. Hier wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden (Abb. 14 A). Im Rahmen der hämatologischen und klinisch-chemischen Untersuchung von Blutproben der Tiere wurde für beide Geschlechter eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhte Thrombozytenzahl gefunden (Abb. 14 C). In Männchen wurde zudem eine signifikant geringere Neutrophilenzahl aber erhöhte Lymphozytenzahl für Knock-out Tiere beobachtet (Abb. 14 B). Andere Blutzellparameter wie Hämatokrit, EVB, Monozyten-, Eosinophilen- und Basophilenzahl sowie die Zahl großer, Peroxidase-negativer Zellen, waren hingegen unverändert. Neben den Blutzellzahlen wurden auch die Immunzellpopulationen der Milz mittels FACS untersucht (Abb. 14 H und I). Die Zellzahlen weiblicher Knock-out Tiere unterschieden sich dabei nicht signifikant von denen des Wildtyps. Für männliche Tiere des Knock-out Stamms wurde hingegen eine signifikant erhöhte Anzahl an B-Zellen beobachtet (Abb. 14 I).

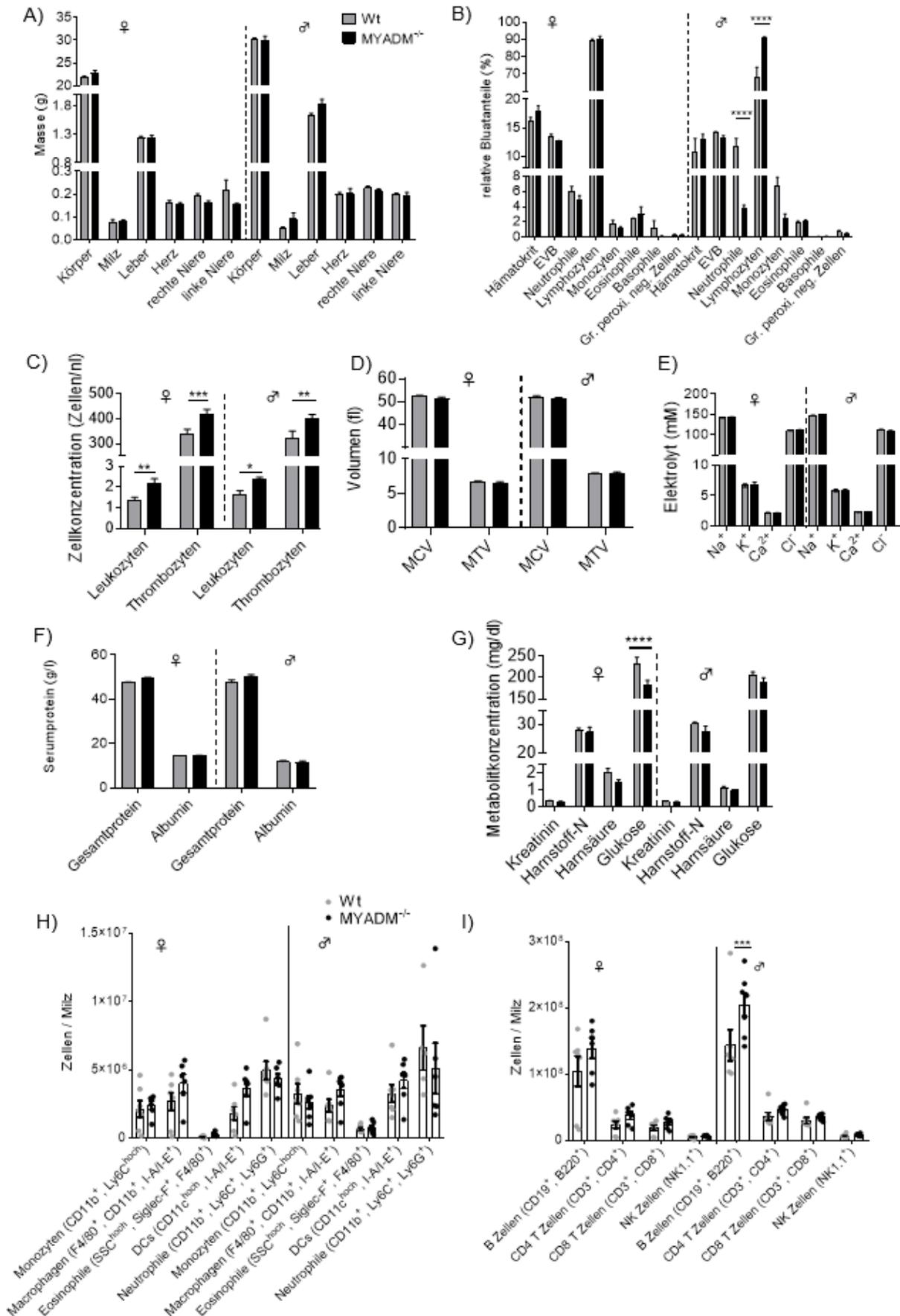


Abb. 14: Phänotypisierung von adulten MYADM-KO-Tieren. A) Körper- und Organgewichte weiblicher und männlicher Knock-out-Tiere im Vergleich mit Wildtypkontrollen. Dargestellte Werte resultieren aus der Untersuchung von je n = 7 Tieren pro Gruppe.

Fortsetzung Abb. 14:

B) Hämatokrit, EVB sowie relative Anteile von Neutrophilen, Leukozyten, Monozyten, Eosinophilen, Basophilen und große/preroxidase-negativen Zellen. Daten von n = 7 Tieren für weibliche MYADM Knock-out- und männliche Wildtyp-Tiere sowie je n = 6 weibliche Wildtyp- und männliche MYADM-Knock-out-Tiere. C) Absolute Zellkonzentration an Leukozyten und Thrombozyten im Blut. Die gezeigten Daten umfassen Messpunkte von n = 6 Tieren pro Gruppe. D) MCV und MTV von Myadm^{-/-} Tieren sowie entsprechenden Wildtyp-Kontrollen. Analysiert wurden je n = 6 Tiere pro Gruppe. E) Blutelektrolytkonzentrationen. Absolute Konzentrationen der Kationen Natrium, Kalium und Calcium sowie des Anions Chlorid. F) Plasmaproteinkonzentration. Messung von Gesamtprotein und Serumalbumin von n = 6 weiblichen und n = 7 männlichen Tieren pro Gruppe. G) Massenkonzentration von Blutstickstoffspezies und Glukose. Konzentration von Kreatinin, Harnstoff-N und Harnsäure wurde aus Lithium-Heparin-Plasma bestimmt, zusätzlich wurde die Glukosekonzentration bestimmt. I) Bestimmung von Serumgesamtprotein und Albumin. H) Zellpopulationen der Milz nach Verdau. Absolute Zahlen von Monocyten, Makrophagen, Eosinophilen und Dendritischen Zellen (DC). I) Immunzellpopulationen der Milz. Absolute Zahlen von B-, T- und NK-Zellen der Milz für MYADM-KO-Tiere im Vergleich zu entsprechenden B6JRj-Wildtyp-Kontrollen. Analysiert wurden je n = 7 Tiere pro Gruppe. Die verwendeten Tiere wiesen ein Alter von 16 Wochen auf. Die Messung der hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter erfolgte instrumentell durch das Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Mittelwerte unter Angabe des Standardfehlers grafisch dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels ANOVA unter Angabe folgender Signifikanzniveaus: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, ns: p>0.05. Ca²⁺: Calciumionen, Cl⁻: Chloridionen, DC: Dendritische Zelle(n), EVB: Erythrocytenverteilungsbreite, K⁺: Kaliumionen, MCV: mittleres korpuskuläres Volumen, MTV: Mittleres Thrombozytenvolumen, Na⁺: Natriumionen, Wt: Wildtyp

Für die Analyse der Immunzellpopulation der Milz wurden die Tiere mittels Kohlenstoffdioxidexposition getötet, die Milz entnommen und mittels Kollagenase D und RNase I zu einer Einzelsuspension verdaut. Anschließend wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die gegen typische Oberflächenmarker von Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen, Eosinophilen und Dendritische Zellen gefärbt und mittels Durchflusszytometrie identifiziert. Die entsprechende *gating*-Strategie ist in Abb. 15 dargestellt. Die absolute Quantifizierung der Zellen erfolgte durch Nutzung einer bekannten Menge Zählpartikel im Rahmen der Messung.

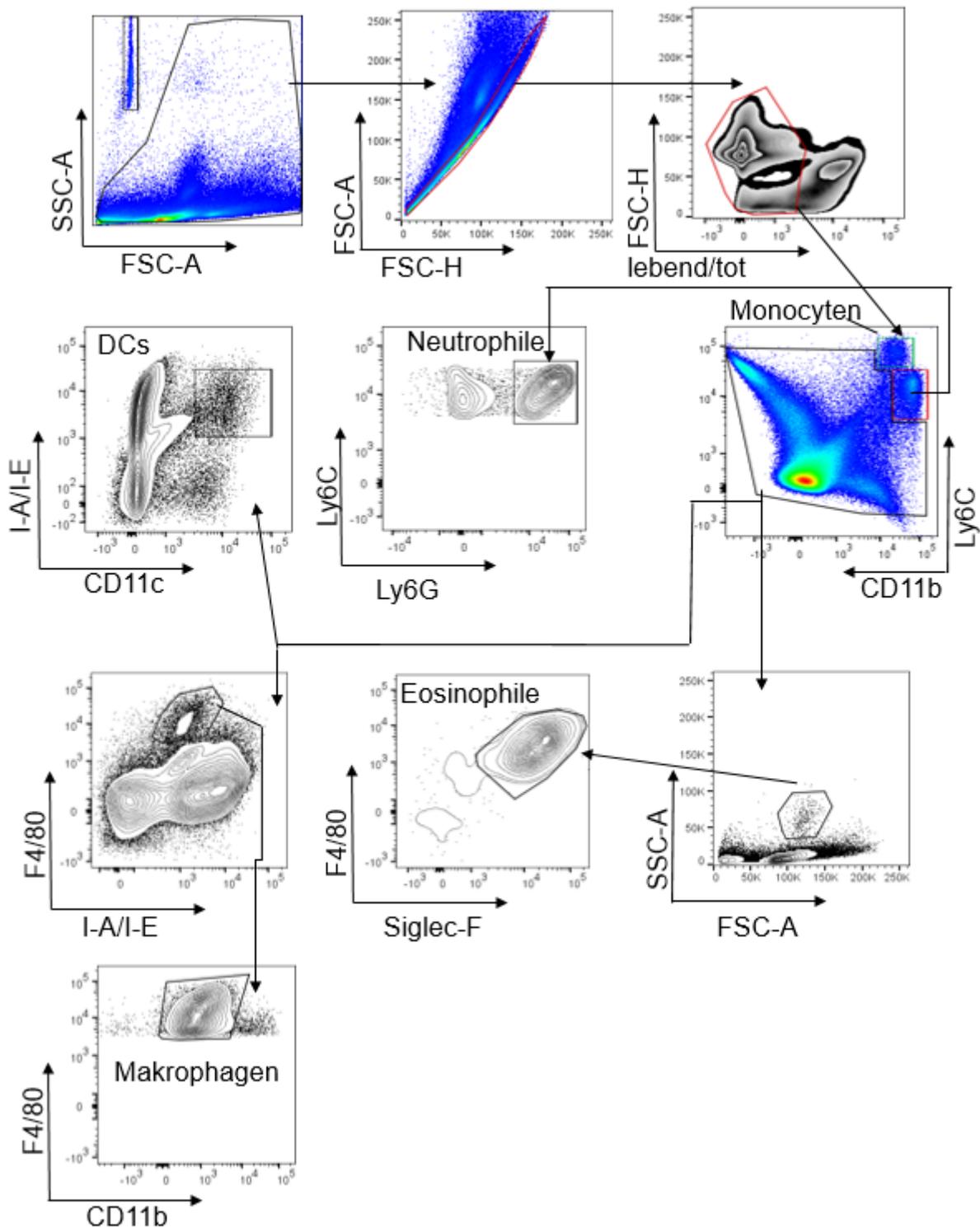


Abb. 15: Gating-Strategie für die Analyse myeloider Zellpopulationen der Milz von MYADM-Tieren. Milzen wurden mit Kollagenase D und RNaseI verdaut und die erhaltene Einzellsuspension mit Antikörpern gegen typische myeloide Oberflächenantigene gefärbt, die Quantifizierung der Zellen wurde durch Zugabe von Zählpartikeln gewährleistet. Die Zellpopulation wurde hinsichtlich Einzelzellen und Lebendzellen analysiert. Von dort ausgehend wurden die weiteren Zellpopulationen identifiziert. Monozyten wurden als CD11b⁺/Ly6C^{hoch} Zellen identifiziert. Neutrophile wurden ausgehend von der CD11b⁺/Ly6C^{mittel}-Population als CD11b⁺/Ly6C^{mittel}/Ly6G⁺ identifiziert. Makrophagen wurden als CD11b⁺/F4/80⁺/I-A/I-E⁺ Population identifiziert. Dendritische Zellen wurden als CD11b⁺/CD11c⁺/I-A/I-E⁺ definiert. Ausgehend von FSC/SSC wurden Eosinophile als F4/80⁺/Siglec-F⁺-Zellen identifiziert.
 CD: Cluster of Differentiation, FSC: Vorwärtsstreulicht, SSC: Seitwärtsstreulicht.

Neben der Analyse myeloider Zellpopulationen wurden auch Zelltypen der lymphoiden Reihe näher untersucht. Mittels Antikörperfärbung gegen typische Oberflächenantigene und nachgeschalteter durchflusszytometrischer Analyse wurden NK-Zellen sowie B- und T-Lymphozyten unter Nutzung von Zählpartikeln quantifiziert. Die zugrundeliegende Analysestrategie ist in Abb. 16 graphisch dargestellt.

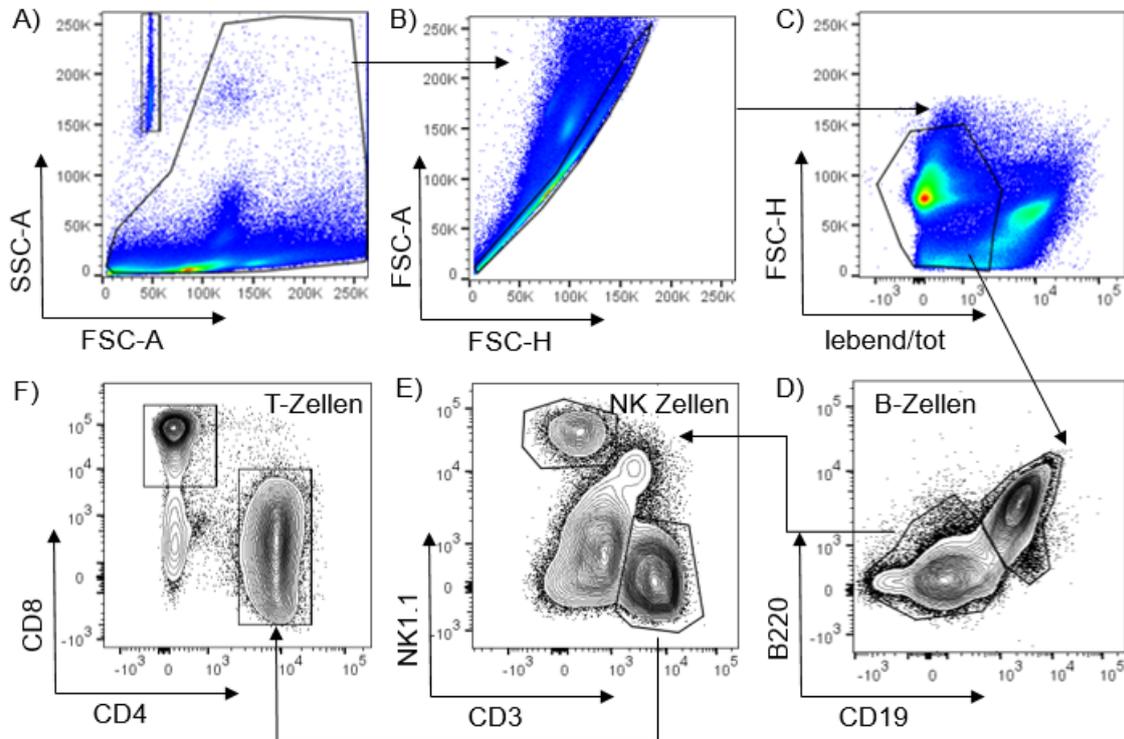


Abb. 16: Gating-Strategie für NK-Zellen sowie B- und T-Lymphozyten der Milz. Milzen der *Knock-out*-Tiere und entsprechender C57B6/J-Kontrolltiere wurden mittels Kollagenase D und RNaseI verdaut. Die erhaltene Einzelzellsuspension wurde für die Antikörperfärbung gegen typische Oberflächenantigene der Immunzellpopulationen eingesetzt. A) Ausgehend von der Gesamtzellpopulation wurde zunächst über FSC/SSC auf Einzelzellen gegatet (B). Nachfolgend wurde die Lebendzellpopulation identifiziert (C). D) B-Zellen wurden als $CD19^+B220^+$ Zellen identifiziert. Ausgehend von der nicht-B-Zellpopulation konnten NK-Zellen als $CD3^+NK1.1^+$ Zellen identifiziert werden (E). Die $CD3^+$ -positive Population wurde hinsichtlich Expression von $CD4$ und $CD8$ untersucht (F) und entsprechend $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen identifiziert. CD: Cluster of Differentiation, FSC: Vorwärtsstreulicht, SSC: Seitwärtsstreulicht.

Bei Analyse der B-Zellpopulation konnte eine gegenüber entsprechend Wildtyp-Tieren signifikant erhöhte B-Zellzahl in der Milz männlicher MYADM-Knock-out Mäuse festgestellt werden. Für die weiblichen Tiere ist ein Trend sichtbar, die Effekte sind hier jedoch nicht signifikant (Abb. 14 I).

4.2.3. Untersuchungen zur Cytokinsekretion in MYADM-Knock-out Mäusen

Um den Einfluss eines MYADM-Funktionsverlusts auf die Cytokinsekretion zu überprüfen, wurden BMDM mit den TLR-Agonisten LPS und LTA, sowie Typ I- und Typ II-Interferonen stimuliert (Abb. 17). Die Konzentration des innerhalb eines Inkubationszeitraums von 24 Stunden in den Zellkulturüberstand sekretierten IL-27(p28) wurde im zellfreien Überstand mittels ELISA bestimmt. Hierbei konnte unter den gewählten Bedingungen kein signifikanter Unterschied zwischen $MYADM^{-/-}$ und Wildtyp-BMDM bezüglich der absoluten Konzentration sekretierten IL-27 festgestellt werden.

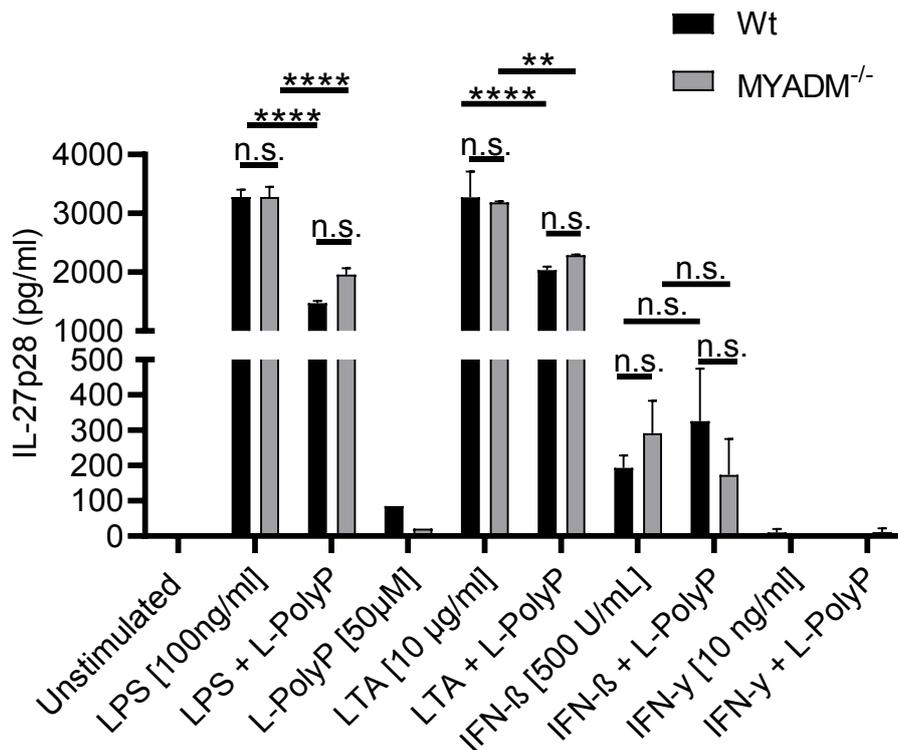


Abb. 17: Einfluss eines MYADM-Verlusts auf die Antwort gegenüber TLR2 und TLR4 Agonisten sowie Interferonen. Konzentrationsbestimmung des durch BMDM nach 24-stündiger Stimulation *in vitro* sekretierten IL-27(p28). Die Bestimmung von IL-27(p28) im zellfreien Zellkulturüberstand nach 24-stündiger Inkubation erfolgte mittels ELISA. Ein Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen bezüglich der Cytokinsekretion konnte nicht gefunden werden ($p > 0.05$). Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen, unabhängigen Experiments von $n = 3$ Experimenten unter Angabe von Mittelwert und Standardfehler. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels ANOVA unter Angabe folgender Signifikanzniveaus: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns: $p > 0.05$

IFN: Interferon, IL-27: Interleukin-27, LPS: Lipopolysaccharid, LTA: Lipoteichonsäure, MYADM: *Myeloid-associated differentiation factor*, PF4: *Platelet factor 4* (CXCL4), Wt: Wildtyp (C57BL/6J).

4.2.4. IL1R2 und TGFβR2 sind in MYADM^{-/-} Mäusen reduziert exprimiert

Der TGFβ-Rezeptor (TGFβR2) sowie der IL-1 decoy Rezeptor (IL1R2) sind bekannte molekulare Interaktoren von hMYADM. Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob der Verlust von MYADM zu einer Modulation der Expression dieser beiden Zielproteine führt. Dafür wurde die Expression in BMDM auf Transkriptebeine mittels quantitativer PCR untersucht (Abb. 18). Hierbei konnten signifikant niedrigere Transkriptmengen der beiden Zielgene im MYADM-Knock-out festgestellt werden. Die Transkriptmenge im Knock-out beträgt dabei etwa $\frac{2}{3}$ bis $\frac{3}{4}$ der im Wildtyp vorgefundenen und auf 1,0 normierten Referenzmenge.

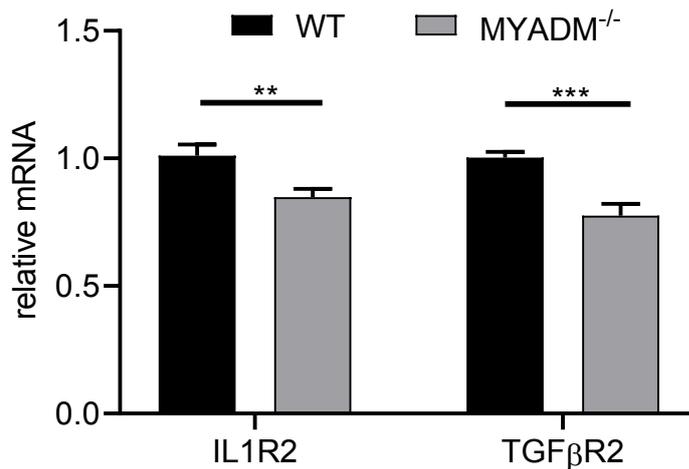


Abb. 18: IL1R2 und TGFBR2-Expression in MYADM^{-/-} BMDM. Expression von IL1R2 und TGFBR2 ist in MYADM-Knock-out BMDM gegenüber dem Wildtyp signifikant reduziert. Dargestellt sind Daten aus n = 3 unabhängigen Experimenten unter Angabe der Mittelwerte und des Standardfehlers. Statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA unter Angabe folgender Signifikanzniveaus: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, ns: p>0.05.

4.3. TMEM206-Knock-out

4.3.1. TMEM206 bindet L-PolyP und ist ein LPS-reguliertes Gen

TMEM206 wurde im Rahmen von Partikel-basierten PolyP-Bindungsexperimenten mit anschließender massenspektrometrischer Identifizierung der gebundenen zellulären Proteine als PolyP-bindendes Protein identifiziert. Die Anreicherung des Proteins gegenüber der Kontrolle nicht PolyP-behandelter Partikel war etwa vierfach größer (Abb. 19A). Seine Membranlokalisation, die starke Regulation durch LPS sowie der Effekt von L-PolyP auf die Expression (Abb. 19B), machten TMEM206 zu einem interessanten Kandidaten für die Bindung von L-PolyP und die Modulation zellulärer immunologischer Effekte. Darüber hinaus konnten bereits mehrere, im Humansystem beschriebene, molekulare Interaktionen mit Schlüssel-molekülen der zellulären Signalgebung, der Immunantwort und des zellulären Transports gefunden werden (Abb. 19 C). Insbesondere die Interaktion mit STAT3 und MHC-Molekülen (HLA-C und HLA-DRA) legten eine Beteiligung von TMEM206 an immunologischen Prozessen nahe.

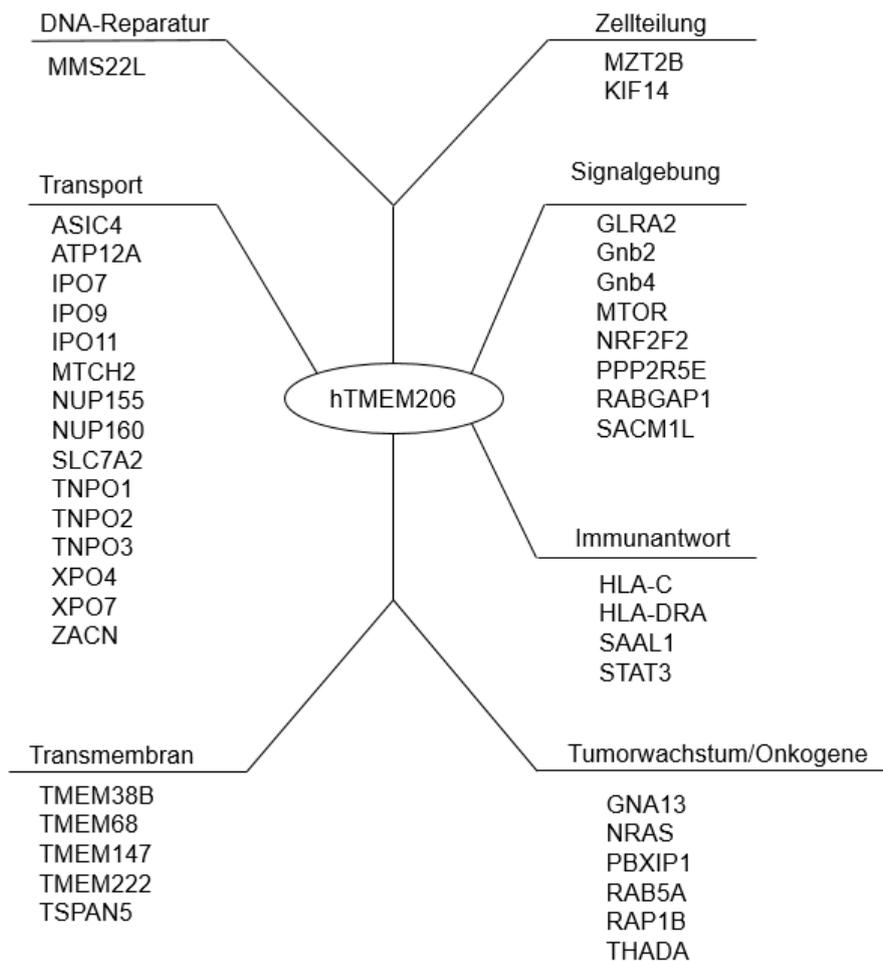
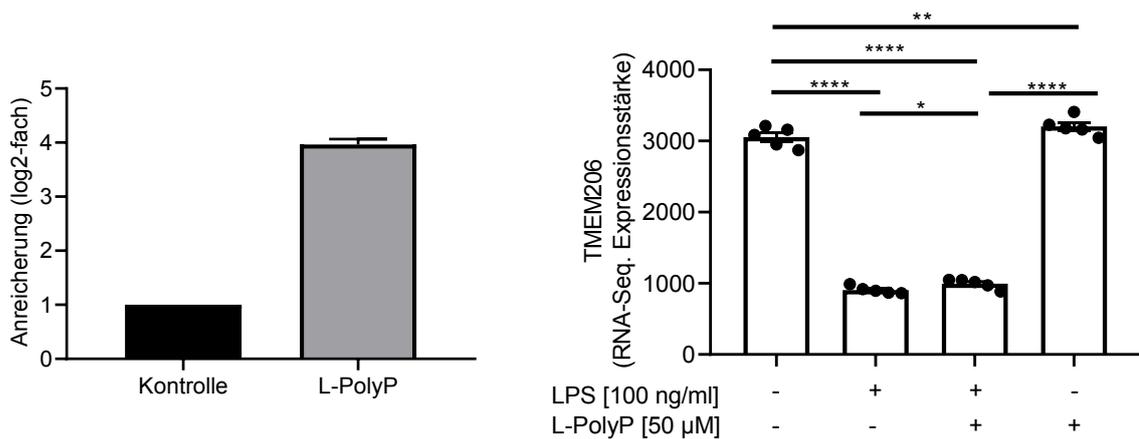


Abb. 19: Anreicherung von TMEM206 durch Bindung an L-PolyP, Expression in BMDM und bekannte molekulare Interaktoren. A) Datenanalyse massenspektrometrischer Untersuchung von Gesamtzelllysaten muriner BMDM. Nach Inkubation mit L-PolyP-gekoppelten Mikropartikeln wurde die gebundene TMEM206-Fraktion massenspektrometrisch identifiziert. Gezeigt sind Daten von n = 3 biologischen Replikaten. B) Expression und Modulation von TMEM206 in BMDM in Abhängigkeit von Stimulation mit LPS und L-PolyP. Die Expressionsstärke wurde durch Analyse von in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen RNA-Seq-Daten bestimmt. Nach LPS-Stimulation wurde eine signifikant verminderte Expression von TMEM206 festgestellt, während L-PolyP keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl der Transkripte zeigte. Gezeigt sind Daten von n = 5 Mäusen pro Gruppe als Mittelwert ± Standardabweichung, statistische Analyse erfolgte durch gepaarten Student-t-Test, Signifikanzniveaus: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, ns: p>0.05.

Fortsetzung Abb. 19:

C) Bekannte Interaktionspartner von humanem TMEM206. Die Datenlage für murines TMEM206 ist noch unzureichend, weshalb die Humandaten präsentiert wurden. Eine Vielzahl der Interaktoren konnten zellulären Transportprozessen und der Signalgebung zugeordnet werden. Weitere Transmembranproteine der TMEM-Familie sind als Interaktoren bekannt. Darüber hinaus interagiert TMEM206 mit einer Vielzahl onkogener Faktoren wie N-Ras (Breitkreutz et al., 2003; Huttlin et al., 2017).

ASIC4: *Acid-sensing ion channel 4*, ATP12A: *ATPase H⁺/K⁺ transporting non-gastric alpha2 subunit*, GNA13: *Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13*, HLA: *Human leukocyte antigen*, IPO: *Importin*, MTCH: *Mitochondrial carrier homolog 1*, mTOR: *mammalian Target of Rapamycin*, NRAS: *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*, PBXIP1: *Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1*, RAB5A: *Ras-related protein Rab-5A*, RAP1B: *Ras-related protein Rap-1b*, SAAL1: *serum amyloid A like 1*, SLC: *Solute Carrier*, THADA: *Thyroid adenoma associated*, TMEM: *Transmembrane protein*, TNPO: *Transportin*, TSPAN: *Tetraspanin*, XPO: *Exportin*, ZACN: *Zinc Activated Ion Channel*.

4.3.2. TMEM206^{-/-} Mäuse sind lebensfähig, fertil und zeigen keinen krankhaften Phänotyp

Um die immunologische Funktion von TMEM206 und seine Rolle als mutmaßlicher PolyP-Rezeptor zu untersuchen, wurden TMEM206-Knock-out-Tiere durch CRISPR-induzierte Mutagenese erstellt. Dafür wurden zwei gRNA-Paare, die jeweils Deletionen in Exon 2 und Exon 3 induzieren sollten in Zygoten mikroinjiziert. Die behandelten Blastozysten wurden danach in scheinchwangere C57BL6/J-Weibchen transplantiert und die Nachkommen mittels PCR auf Editierungen in Exon 2 und Exon 3 untersucht. Für Exon 2 konnte eine erfolgreiche Editierung mittels PCR festgestellt werden, während für Exon 3 keine relevanten Mutationen detektiert werden konnten. Positiv typisierte Tiere wurden mit C57BL6/J-Tieren für fünf Generationen zurückgekreuzt. Für Exon2-Mutation heterozygot typisierte Tiere wurden untereinander verpaart. Anschließend wurden homozygot typisierte Tiere weiter verpaart.

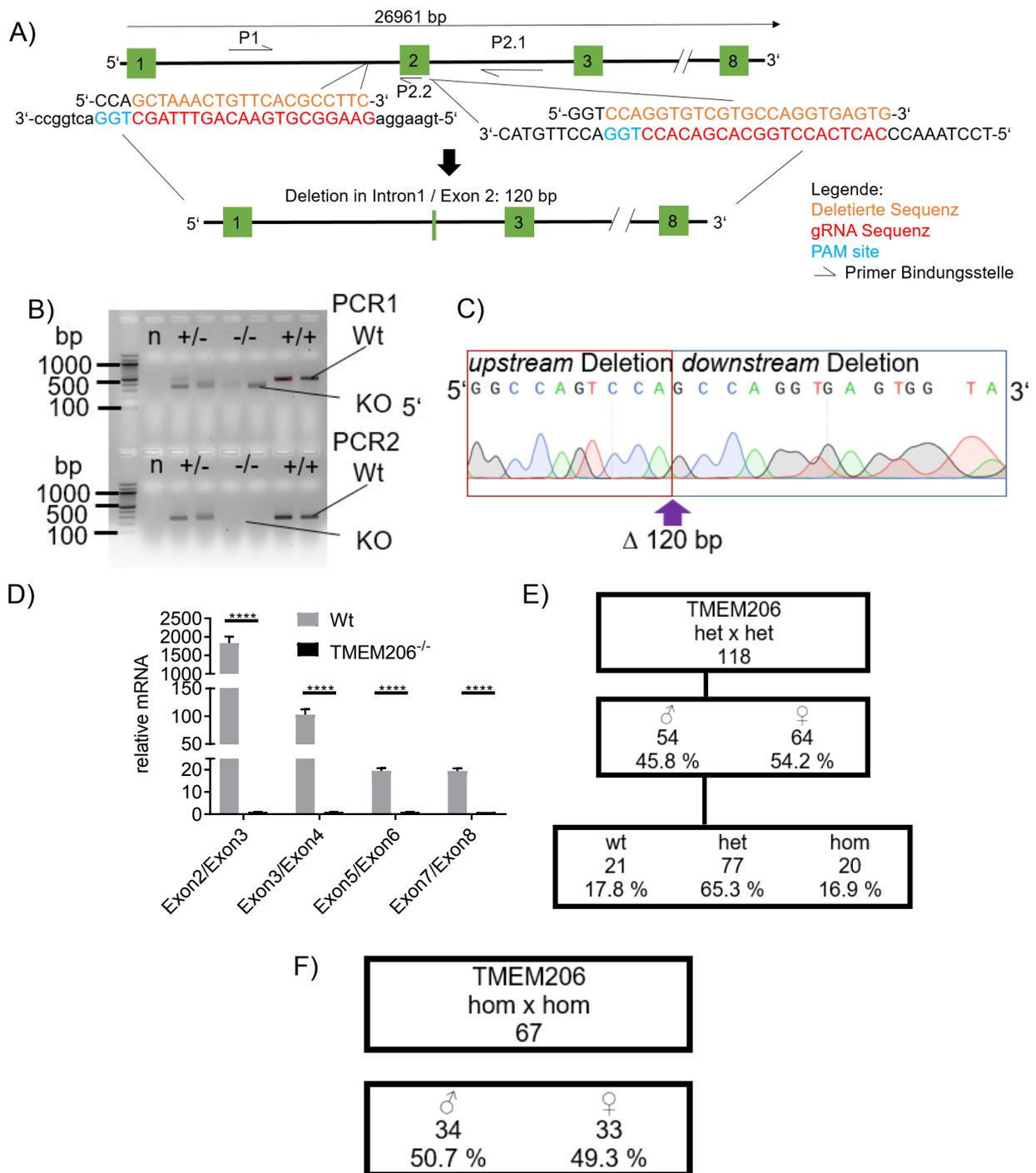


Abb. 20: CRISPR-Strategie, PCR-Genotypisierung, Sequenzierung und Zuchtstatistik für TMEM206-Knock-out-Mäuse. A) CRISPR-Editierung von Exon 2 des TMEM206-Gens. Ein gRNA-Paar, das Exon 2 flankiert, wurde in Blastocysten mikroinjiziert. Behandelte Blastocysten wurden in scheinsschwangere B6J-Weibchen transferiert und die Nachkommen durch PCR hinsichtlich gewünschter Genomeditierung untersucht. B) PCR-basierte Genotypisierung von Nachkommen. Durch zwei getrennte PCR-Reaktionen an den in A) angegebenen Stellen (P1+P2.1/P1+P2.2) ist eine robuste Unterscheidung zwischen homozygoten, heterozygoten und Wildtyp-Tieren möglich. C) Repräsentatives Chromatogramm der Sanger-Sequenzierung homozygoter Nachkommen. Sanger-Sequenzierung offenbart eine Deletion von 120 bp Größe in Exon 2 des TMEM206-Gens. D) Relative Menge TMEM206-mRNA in TMEM206-Knock-out Tieren im Vergleich mit entsprechenden Wildtyp-Kontrollen. E) Zuchtstatistik heterozygoter Verpaarung von TMEM206^{+/-} Tieren. F) Geschlechtsverteilung in homozygoter Zucht von TMEM206-Knock-out-Tieren. bp: Basenpaar(e), Δ : Deletion, gRNA: *guide RNA*, het: heterozygot, hom: homozygot, KO: Knock-out, P: Primerbindungsstellen, PAM: *Protospacer adjacent motif*, Wt: Wildtyp (C57BL/6J).

Der generierte Knock-out wurde neben DNA-Sequenzierung zum Nachweis der genomischen Deletion auch auf RNA-Ebene bezüglich TMEM206-Expression untersucht. Auf Transkriptebene konnte im Knock-out eine drastische Reduktion der TMEM206-Transkripte im Vergleich mit Wildtyp-Tieren nachgewiesen werden (Abb. 20 D).

Zur Beurteilung der Viabilität und Fertilität der Tiere wurden innerhalb der regulären Zucht homo- und heterozygote Verpaarungen angesetzt und Zuchtstatistiken geführt. Homo- und heterozygote Verpaarung zeigten, dass TMEM206-Knock-out Tiere sowohl lebensfähig als auch fertil sind. Die Proportionen, der aus heterozygoter Verpaarung (Abb. 20 E) erhaltenen Genotypen, waren 18 % Wildtyp, 65 % heterozygote und 17 % homozygote Tiere (Verhältnis etwa 1:3,7:1). Das aus homozygoter Verpaarung erhaltene Geschlechtsverhältnis lag bei etwa 51 % männlichen und 49 % weiblichen Tieren (Abb. 21 F).

Neben der Zuchtanalyse wurden TMEM206^{-/-} Tiere auch bezüglich eines möglichen Einflusses des TMEM206-Funktionsverlusts auf die körperliche Entwicklung und Blutzellpopulationen sowie klinisch-chemische Parameter untersucht. Beim Vergleich der Körper- und Organgewichte adulter Knock-out und Wildtyp-Tiere zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 21 A). Auffällig im Rahmen der klinisch-chemischen Untersuchungen war hingegen eine verringerte Neutrophilen- und erhöhte Lymphozytenzahl in männlichen Knock-out-Tieren (Abb. 21 B). Darüber hinaus wurde eine gegenüber dem Wildtyp verringerte Blutglukosekonzentration gefunden (Abb. 21 G).

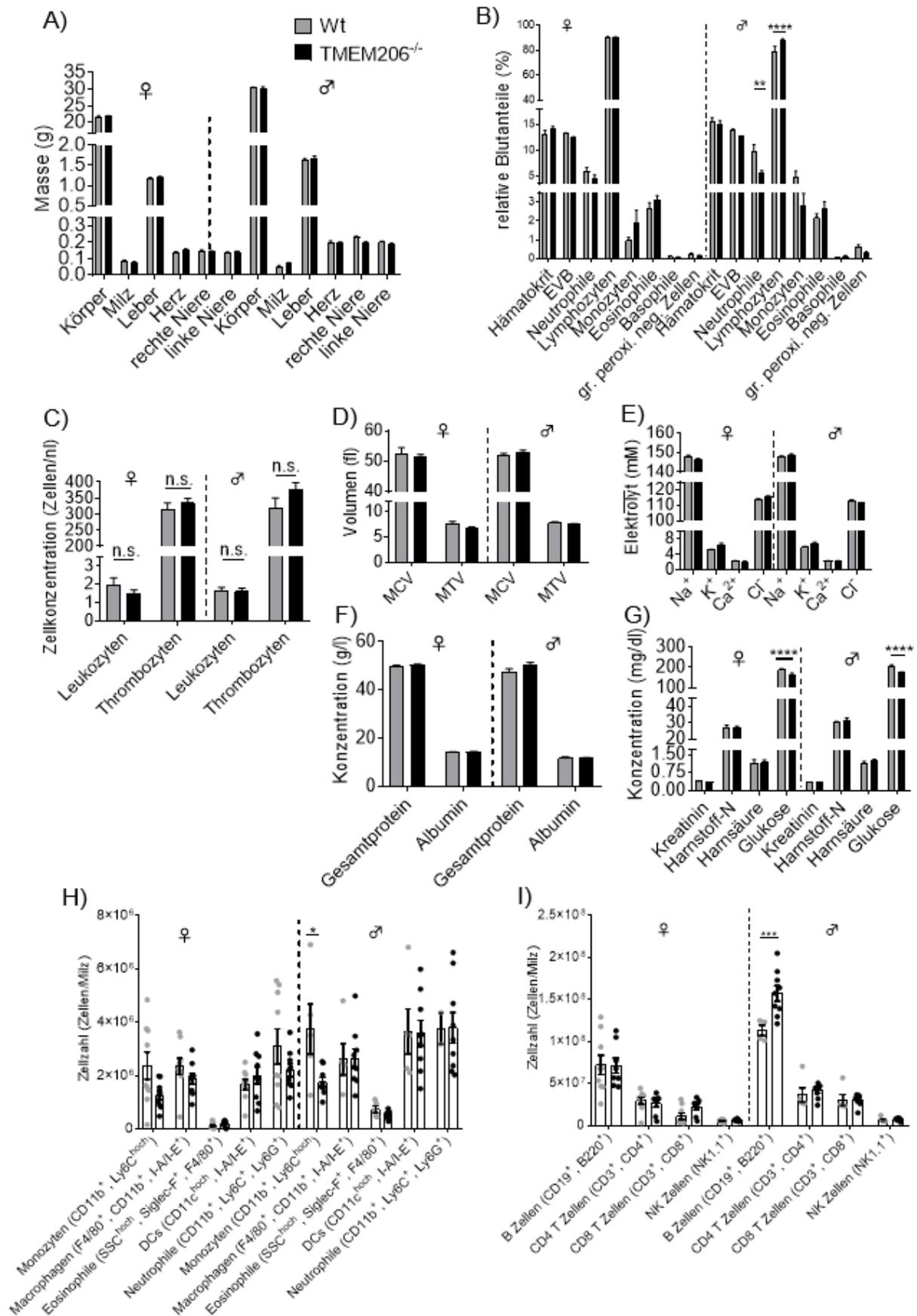


Abb. 21: Körper- und Organengewichte, Blutzellpopulationen und klinisch-chemische Parameter für TMEM206-Knock-out Tiere. A) Körper- und Organengewichte für männliche und weibliche Tiere des TMEM206-Knock-outs. Die Gruppengröße betrug für weibliche Tiere jeweils n = 9, für Männchen n = 7.

Fortsetzung Abb. 21:

B) Hämatokrit, EVB und relative Anteile einzelner Blutzelltypen am Vollblut. Die zur Untersuchung genutzte Tierzahl betrug $n = 9$ pro Gruppe. C) Absolute Zellkonzentration für Leuko- und Thrombozyten in Vollblut. Untersucht wurden je $n = 9$ Weibchen und $n = 7$ Männchen. D) Blutzellparameter MCV und MTV. Gegenübergestellt wurden die Werte von $n = 7$ untersuchten Tieren je Gruppe. E) Blutelektrolytkonzentration in Li-Heparin-Plasma. Dargestellt sind Werte von $n = 5$ Weibchen und $n = 7$ Männchen pro Gruppe. F) Plasmagesamtprotein und Albumin. Untersucht wurden $n = 9$ Weibchen sowie $n = 7$ Männchen je Genotyp. G) Metabolit- und Glukosekonzentration. Dargestellt sind Werte von $n = 7$ untersuchten Tieren je Gruppe und Geschlecht. H) Absolute Bestimmung von Immunzellpopulationen der angeborenen Immunantwort aus der Milz. Dargestellt sind die Werte von $n = 9$ untersuchten Tieren. FACS-Gating erfolgte analog zur Abb. 15 I) Immunzellpopulationen der lymphoiden Reihe (B- und T-Zellen) sowie NK-Zellen der Milz von TMEM206-Knock-out Tieren beider Geschlechter im Vergleich mit entsprechenden Wildtyp-Kontrollen mit ebenfalls neun Tieren pro Gruppe. FACS-Gating erfolgte analog zur Abb. 16. Die Messung der hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter erfolgte instrumentell über das Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz. Graphisch dargestellt wurden jeweils die Mittelwerte unter Angabe des Standardfehlers. Die statistische Analyse der Werte erfolgte jeweils mittels ANOVA. Signifikanzlevel wurden folgendermaßen indiziert: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Werte die sich nicht signifikant unterschieden, wurden der Übersichtlichkeit halber nicht markiert. DC: Dendritische Zelle(n), EVB: Erythrocytenverteilungsbreite, MCV: mittleres korpuskuläres Volumen, MTV: Mittleres Thrombozytenvolumen, Wt: Wildtyp (C57BL6/J).

4.3.3. TMEM206 ist in professionellen Antigen-präsentierenden Zellen stark exprimiert

Zur Fortführung der Untersuchungen wurde zunächst die Expression von TMEM206 in dem Modellsystem BMDM sowie die fehlende Expression im TMEM206 Knock-out sichergestellt. Hierfür wurden reife BMDM durchflusszytometrisch anhand ihrer CD11b- und F4/80-Expression identifiziert und mittels intrazellulärer RNA-Färbung unter Verwendung TMEM206-spezifischer Sonden bezüglich TMEM206-Expression untersucht (Abb. 22).

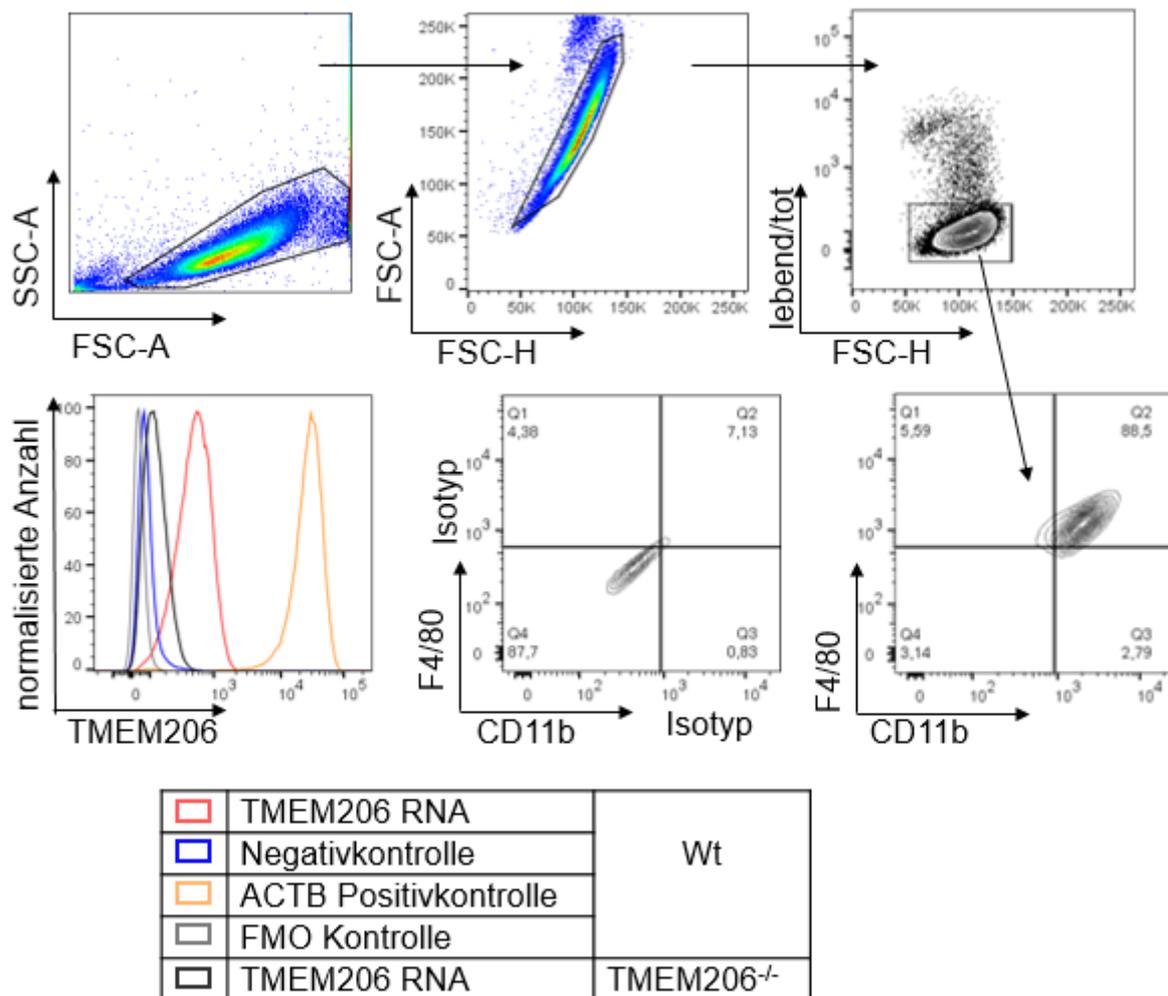


Abb. 22: Expression von TMEM206 in BMDM. Unstimulierte BMDM wurden Sonden-basiert intrazellulär auf TMEM206 Transkripte gefärbt und per FACS analysiert. Zellen (A) wurden nach Einzel- (B) und Lebendzellen gegatet. Die nach Isotypkontrolle (E) F4/80 und CD11b-positive Lebendzellpopulation (D) wurde auf Stärke der TMEM206-Expression untersucht (F). Als Negativkontrollen wurden ungefärbte Zellen, FMO sowie Zellen des TMEM206-Knock-outs verwendet. Als Positivkontrolle dienten Transkripte des β -Aktin Gens. Im Vergleich zu Negativ- und Positivkontrollen zeigt sich in BMDM eine Expression von TMEM206.

ACTB: β -Actin, CD: *Cluster of Differentiation*, FMO: *Fluorescence minus one*-Kontrolle, FSC: Vorwärtsstreulicht, SSC: Seitwärtsstreulicht, TMEM206: *Transmembrane protein 206*, Wt: Wildtyp (C57BL6/J).

Nach Bestätigung der Expression von TMEM206 in Wildtyp-BMDM sowie der Abwesenheit nennenswerter Transkriptmengen im Knock-out (Abb. 22), wurden weitere Immunzelltypen hinsichtlich ihrer Expression untersucht. Dafür wurden Einzelzellsuspensionen aus Milzhomogenaten von TMEM206^{-/-} Tieren und entsprechenden Wildtypkontrollen hergestellt und die einzelnen myeloiden und lymphoiden Zellpopulationen analog durchflusszytometrisch mittels der Sonden-basierten Methode hinsichtlich ihres TMEM206-Transkriptlevels untersucht (Abb. 23). Für die Auswertung wurden die Zellpopulationen gemäß Abb. 24 *gegatet*.

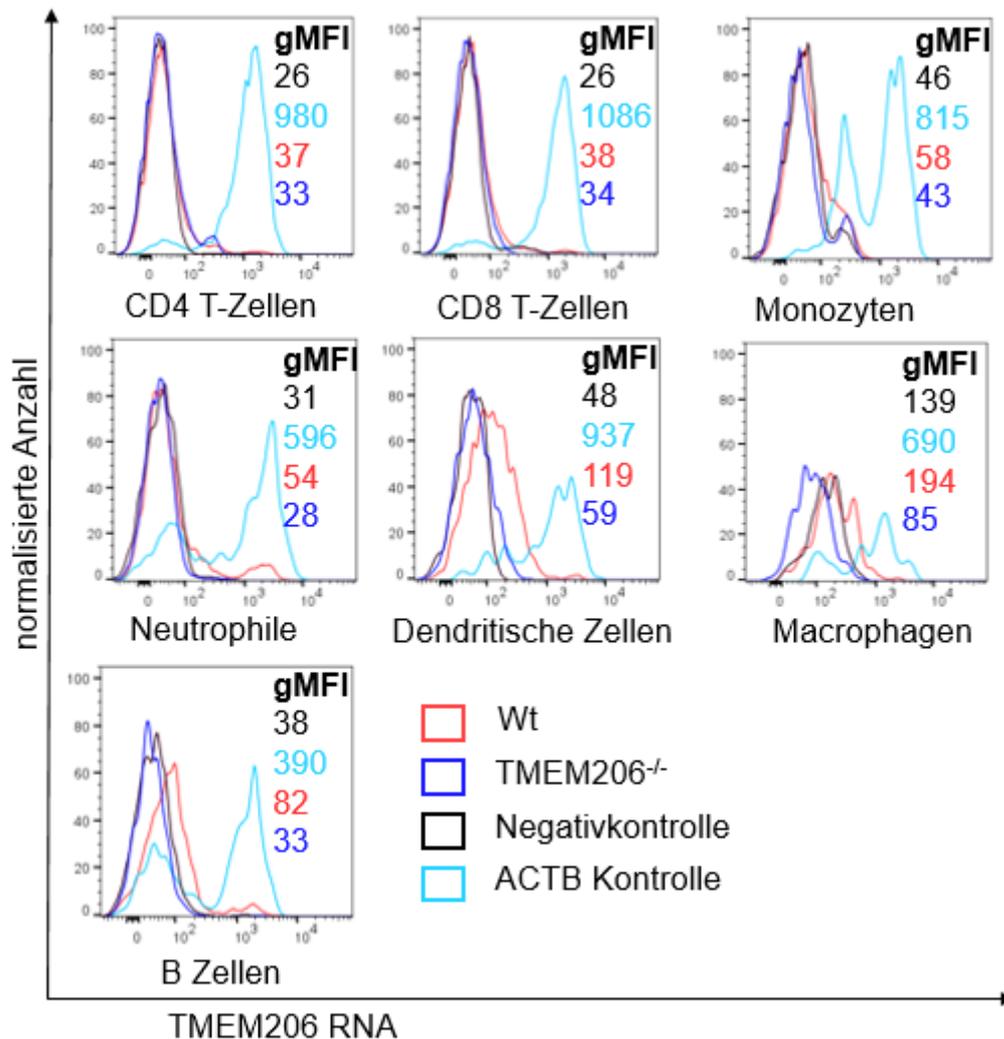


Abb. 23: Expression von TMEM26 in Immunzellpopulationen der Milz. Einzelzellsuspensionen der Milz von TMEM26-Wildtyp-Tieren wurden bezüglich TMEM26-Expression untersucht. TMEM26-Transkripte wurden mit fluoreszenzmarkierten Sonden intrazellulär angefärbt und die Zellpopulationen mittels FACS bezüglich ihrer Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzkanal der TMEM26-Transkripte untersucht. Als Positivkontrolle wurde auf Transkripte des β -Aktin-Gens gefärbt. Als Negativkontrollen wurden ungefärbte Zellen sowie Zellen des TMEM26-Knock-outs genutzt. Eine Expression von TMEM26 konnte vor allem in Dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen festgestellt werden.

ACTB: β -Actin, CD: *Cluster of Differentiation*, gMFI: *geometric mean fluorescence intensity*, TMEM26: *Transmembrane protein 206*, Wt: Wildtyp (C57BL6/J).

Hierbei konnte signifikante Expression von TMEM26 in den professionellen, Antigen-präsentierenden Zellen (APC), namentlich Makrophagen, Dendritischen Zellen und B-Zellen, festgestellt. Die zugrundeliegende *Gating*-Strategie für diese Analyse ist in Abb. 24 dargestellt.

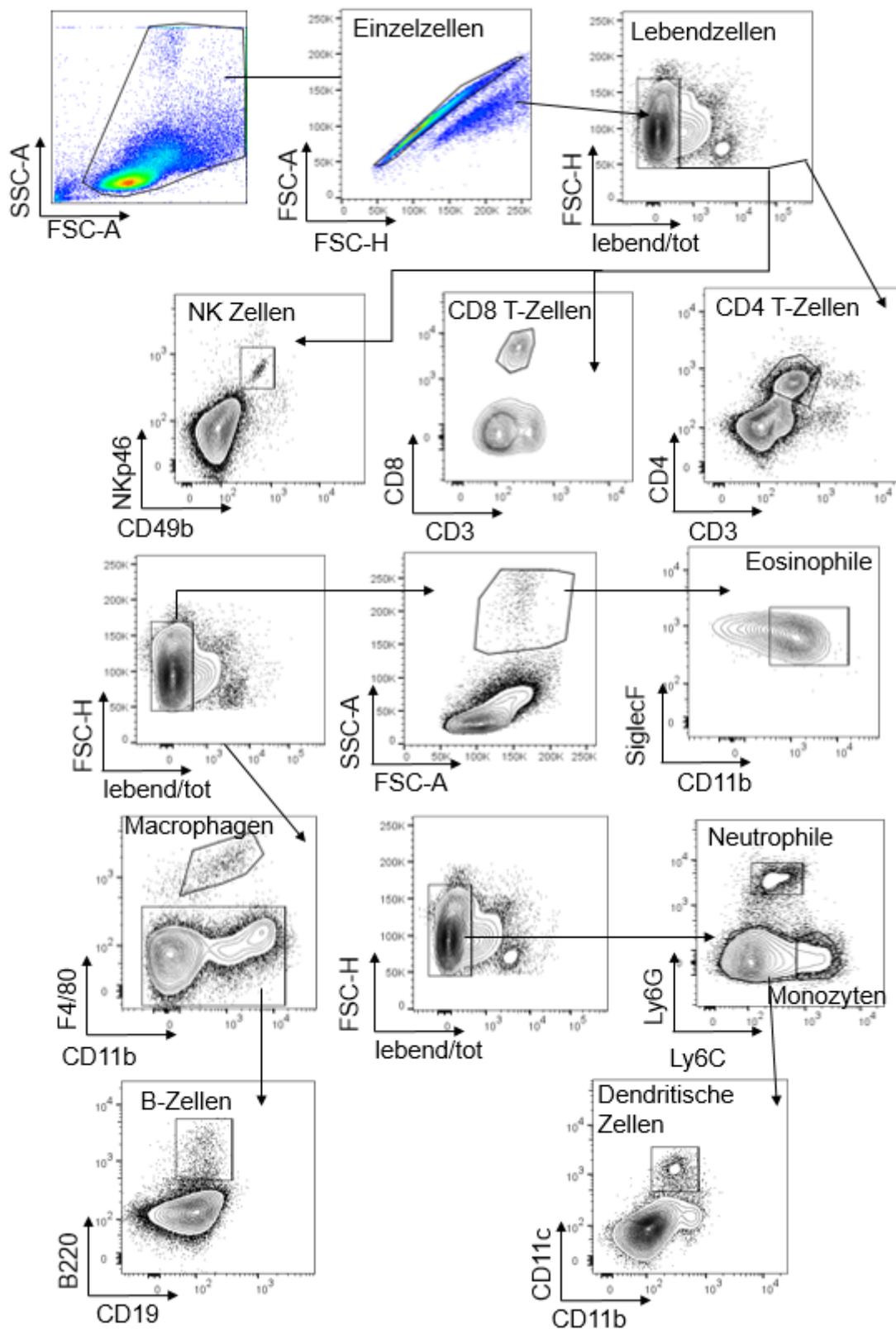


Abb. 24: Gating-Strategie für die Analyse von Immunzellpopulationen der Milz hinsichtlich TMEM206-Expression. Die Gesamtzellpopulation wurde nach FSC-H/FSC-A bezüglich Einzel- und mithilfe einer lebend/tot-Färbung nach Lebendzellen gegatet. Lebendzellpopulationen wurden bezüglich der Expression typischer Oberflächenmarker in einzelne Immunzellpopulationen gegatet. Ausgehend von der Expression von CD3, CD4 und CD8 wurden T-Zellen identifiziert und in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen unterschieden. NK-Zellen wurden als CD49b⁺ NKp46⁺ Zellen identifiziert. Ausgehend von der Lebendzellpopulation wurden Eosinophile aus der SSC^{hoch}-Population als CD11b⁺ Siglec-F⁺-Zellen gegatet.

Fortsetzung Abb. 24:

Makrophagen wurden als CD11b⁺ F4/80⁺ und B-Zellen als CD19⁺ B220⁺ Zellpopulation identifiziert. Neutrophile und Monozyten wurden anhand ihrer Ly6C und Ly6G Expression diskriminiert. Monozyten wurden als Ly6C^{hoch} Zellen bestimmt, Neutrophile als Ly6C^{mittel} Ly6G^{hoch}. Final wurden Dendritische Zellen als CD11b⁺ CD11c⁺ Zellen identifiziert. Diese Zellpopulationen wurden nachfolgend für die Analyse der TMEM206-Expression hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität im TMEM206-RNA-Kanal untersucht.

CD: Cluster of Differentiation, FSC: Vorwärtsstreuung, SSC: Seitwärtsstreuung, TMEM206: Transmembrane protein 206, Wt: Wildtyp (C57BL/6J).

4.3.4. TMEM206^{-/-} BMDM sind gegenüber Säure-induziertem Zelltod geschützt

Yang et al. (2019) und Ullrich et al. (2019) haben TMEM206 kürzlich unabhängig voneinander als eine Komponente von Protonen-aktivierten ASOR-Chlorid-Kanälen identifiziert. Dabei wurde auch beschrieben, dass die Aktivierung der ASOR-Kanäle in Wildtyp-Zellen zu einem in der Folge erhöhten Chlorid-Einstrom in die Zelle führt. Der nachfolgend beobachtete, Säure-vermittelte Zelltod ist dabei vermutlich auf den osmotisch aktiven Chlorid-Influx zurückzuführen, der zum Bersten der betroffenen Zellen führt (Yang et al. 2019; Ullrich et al., 2019; Rungta et al., 2015). TMEM206^{-/-} Zellen erscheinen hingegen gegen diesen Mechanismus des Säure-vermittelten Zelltods geschützt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Beobachtung infolgedessen auch in BMDM untersucht. Dabei wurde der Säure-vermittelte Zelltod durchflusszytometrisch quantifiziert (Abb. 25).

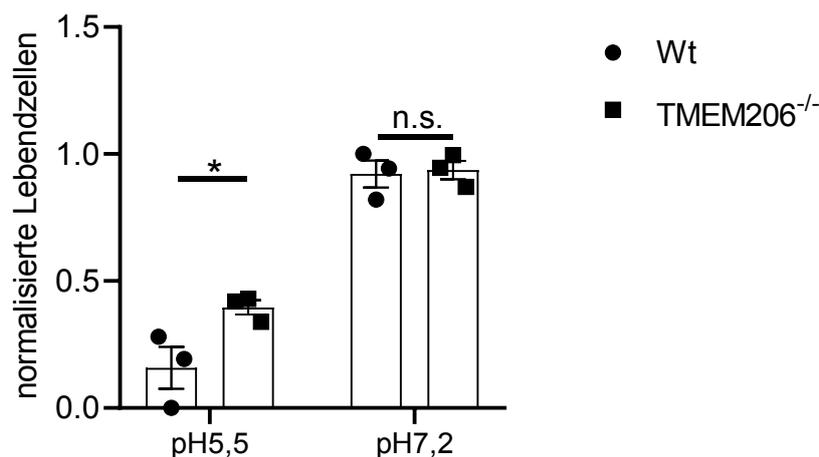


Abb. 25: Bestimmung der Säure-vermittelten Cytotoxizität in BMDM. Unterschiede im zellulären Überleben zwischen TMEM206^{-/-} und C57BL/6J Wildtyp-BMDM wurden bei pH5,5 und pH7,2 durchflusszytometrisch unter Verwendung des Lebend-tot-Farbstoffs *Fixable Viability Dye* (eFluor780) nach 24-stündiger Inkubation bestimmt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels ANOVA unter Angabe folgender Signifikanzniveaus: *p<0.05, ns: p>0.05.

Mittels durchflusszytometrischer Analyse konnten die Lebendzellpopulationen nach 24-stündiger Inkubation in angesäuertem (pH5,5) und pH-neutralem (pH7,2) Medium bestimmt werden. Hierbei konnte beobachtet werden, dass der Anteil der Lebendzellen bei pH5,5 für TMEM206^{-/-} gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöht war. Die Anteile der Lebendzellen bei pH7,2 zwischen Knock-out und Wildtyp waren nach 24 Stunden jeweils nahezu identisch. Die zugrundeliegende *Gating*-Strategie für die Evaluierung der Lebendzellpopulation mittels Durchflusszytometrie kann der Abb. 26 entnommen werden.

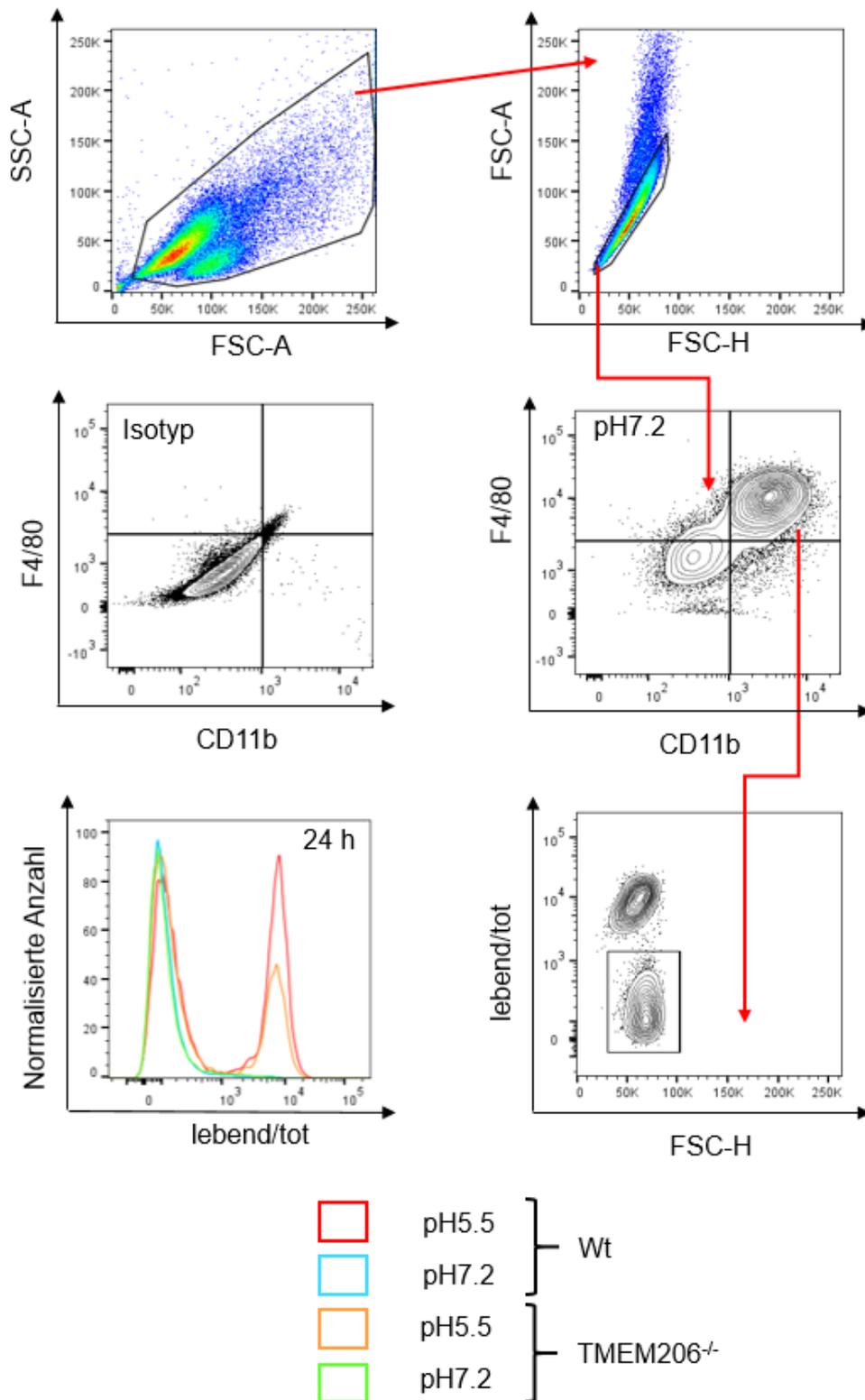


Abb. 26: Gating-Strategie für die Analyse der Lebendzellpopulation von BMDM. Die Lebendzellpopulation reifer BMDM nach Inkubation in pH-neutralem (pH7,2) und saurem Medium (pH5,5) wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierfür wurde zunächst die Zellpopulation mittels Größe und Granularität identifiziert. Danach wurden die Einzelzellpopulation auf die Expression von CD11b und F4/80 untersucht. Anhand der Isotypkontrolle wurde das *Gate* zur Identifizierung der reifen Makrophagenpopulation gesetzt. Anhand der Färbung durch einen Lebend/Tot-Farbstoff wurde anschließend die Lebendzellpopulation identifiziert und zudem als Histogramm dargestellt.

4.3.5. TMEM206^{-/-} BMDM zeigen eine reduzierte antimikrobielle Aktivität

Neben dem zellulären Überleben unter den aziden Bedingungen, die im Rahmen eines Entzündungsgeschehens im betroffenen Gewebe auftreten können, ist auch Induktion einer kompetenten Immunantwort für die Eindämmung einer Infektion entscheidend. Im Folgenden wurde deshalb die Induktion der NO-Synthese in BMDM untersucht. NO wird in Makrophagen primär durch Induktion der NO-Synthase iNOS (NOS2), gebildet und hat eine starke bakterizide Wirkung. Die iNOS-Aktivität wurde auf zweierlei Weise untersucht: Zunächst durchflusszytometrisch nach LPS-Stimulation von BMDM für 24 Stunden. Und nachfolgend auch durch quantitative Messung des stabilen Oxidationsprodukts Nitrat im zellfreien Zellkulturüberstand. Durchflusszytometrisch wurde hierbei nach LPS-Stimulation tendenziell leicht erhöhte iNOS-Expression in Wildtyp-BMDM, die durch L-PolyP signifikant inhibiert wird, gefunden (Abb. 27 B). Unterschiede zwischen Knock-out und Wildtyp konnten hierbei jedoch nicht gefunden werden. Bei Untersuchung der Nitratkonzentration, die mit der Menge synthetisierten NO korreliert, konnten jedoch signifikant verringerte Nitratkonzentrationen für TMEM206-Knock-out BMDM festgestellt werden (Abb. 27 C).

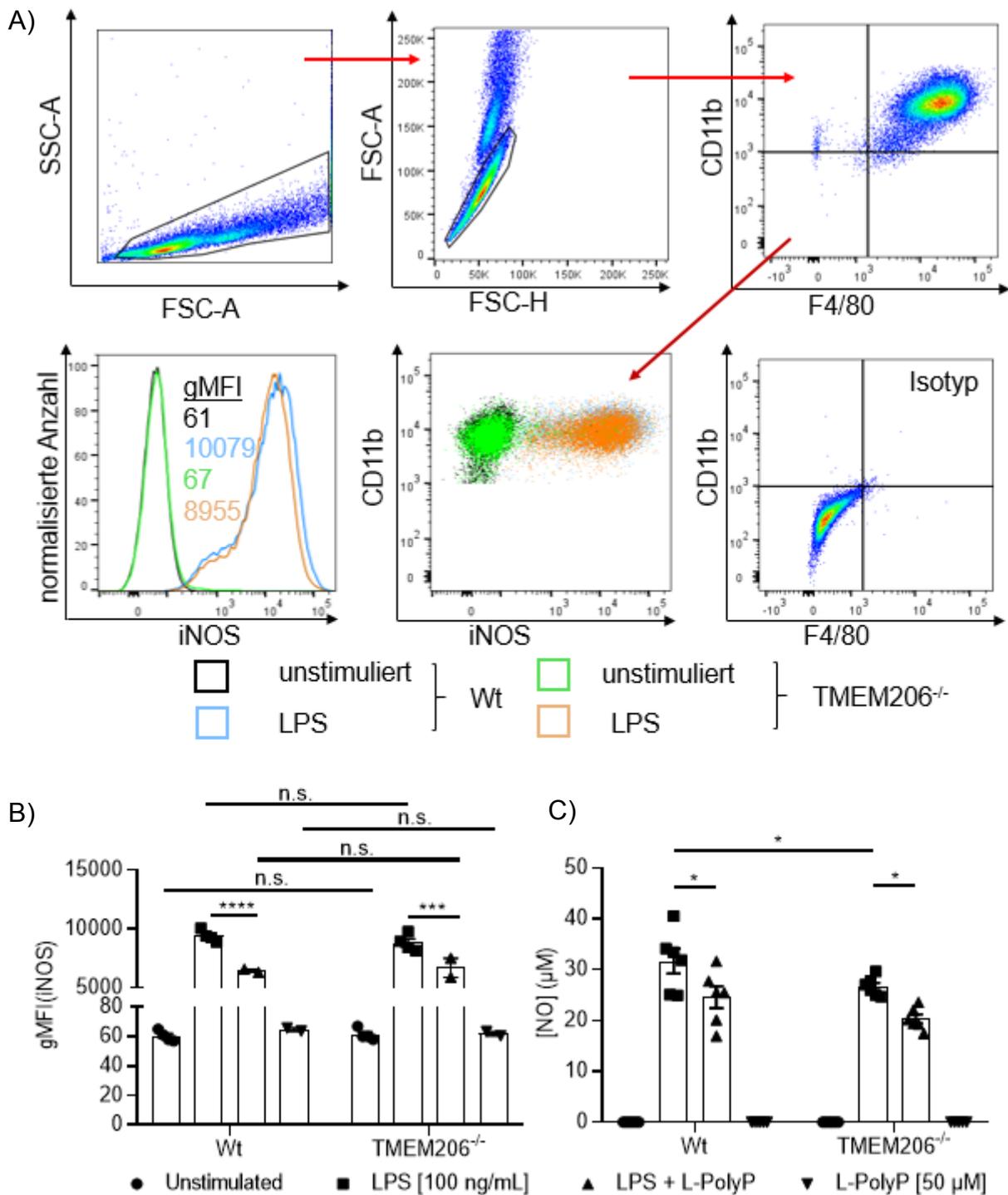


Abb. 27: iNOS-Expression in TMEM206^{-/-} und Wildtyp-BMDM. A) Gating Strategie beginnend von der Identifizierung der Zellpopulation, der Einzelzellen, sowie CD11b- und F4/80-positiver Population. Die CD11b- und F4/80- positive Population wurde anhand der Isotypkontrolle *gated* und bezüglich der iNOS-Expression untersucht. Ein *Dot Plot* sowie repräsentatives Histogramm eines Experiments sind gezeigt. B) gMFI-Werte für iNOS in der CD11b⁺ F4/80⁺ Zellpopulation nach 24-stündiger Inkubation. Gezeigt sind Daten zweier unabhängiger Experimente unter Angabe des Mittelwerts und des Standardfehlers. C) Bestimmung der NO-Konzentration im Zellkulturüberstand nach 24-stündiger Stimulation. Gezeigt sind Daten dreier unabhängiger Experimente unter Angabe von Mittelwert und Standardfehler. Statistische Analyse erfolgte jeweils mittels ANOVA unter Angabe folgender Signifikanzniveaus: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, ns: p>0.05.

Neben der Induktion von iNOS ist für eine kompetente Immunantwort auch die Phagozytose von Pathogenen und anschließende Präsentation der Antigenstrukturen durch professionelle Antigen präsentierende Zellen (APC) entscheidend. Als Maß für die Phagozytoseleistung von BMDM wurde die Aufnahme und anschließende Ansäuerung von mit dem pHrodo-Fluorophor markierten *E. coli*-Partikeln in die Zellen untersucht. pHrodo fluoresziert im neutralen pH-Bereich kaum. Die Fluoreszenz nimmt erst nach Aufnahme in die Zelle und bei Ansäuerung im lysosomalen Weg signifikant zu. Hierbei wurde ein drastischer Unterschied zwischen TMEM206^{-/-} und Wildtyp-BMDM beobachtet (Abb. 28). Die gemessenen pHrodo-Fluoreszenzintensitäten waren für die Knock-out Zellen um etwa die Hälfte gegenüber dem Wildtyp reduziert.

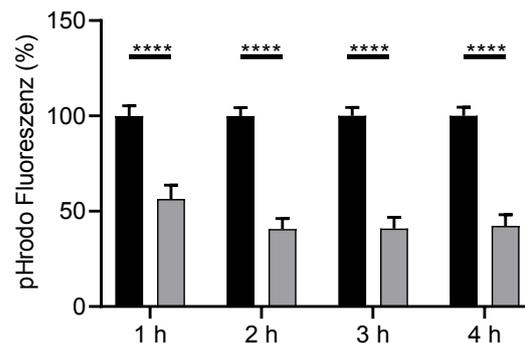


Abb. 28: Indirekte Messung der Phagozytoseleistung von BMDM mit pHrodo *E. coli*. Messung von pHrodo *E. coli*-Phagozytose von TMEM206^{-/-} und Wildtyp-BMDM. Die Phagozytoserate wurde durch Verfolgung der Fluoreszenzemission von BMDM bei 533 nm über die Zeit von vier Stunden verfolgt. Die Phagozytoserate von TMEM206^{-/-} BMDM wurde für jeden Zeitpunkt auf die Werte des Wildtyps normalisiert. Dargestellt sind Daten aus drei (n = 3) unabhängigen Experimenten unter Angabe von Mittelwert und Standardfehler. Statistische Analyse der Daten erfolgte mittels ANOVA unter Angabe folgender Signifikanzniveaus: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, n.s.: p > 0.05.

Zusätzlich zur iNOS- und Phagozytoseaktivität der BMDM wurde auch hinsichtlich Unterschieden in der Cytokinexpression zwischen Wildtyp und TMEM206^{-/-} BMDM untersucht. Hierfür wurden die Zellen jeweils für 24 h mit den TLR-Agonisten LPS und LTA sowie zusätzlich mit IFN-β und IFN-γ jeweils in Gegenwart beziehungsweise Abwesenheit von L-PolyP, stimuliert. Signifikante Unterschiede zwischen Knock-out und Kontrollzellen in der Menge des sekretierten IL-27 konnten unter LPS-Stimulation gefunden werden. Sowohl in Knock-out als auch im Wildtyp konnte die bereits bekannte, schwache Inhibition der IL-27 Freisetzung durch L-PolyP detektiert werden.

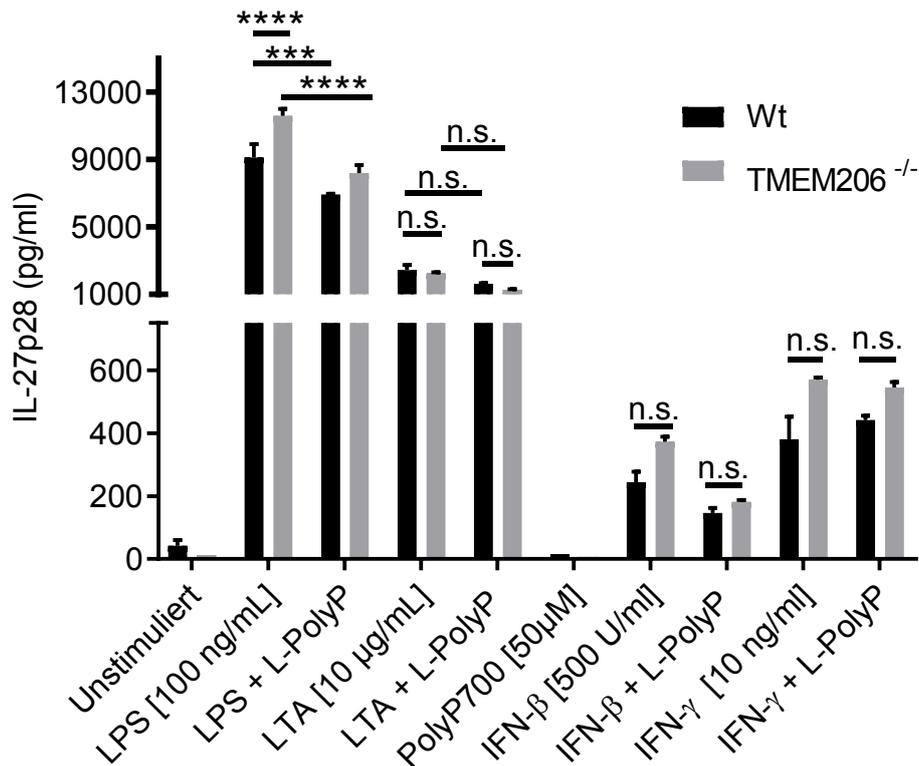


Abb. 29: Cytokinsekretion durch TMEM206^{-/-} BMDM im Vergleich zum Wildtyp. Sekretion von IL-27(p28) nach Stimulation mit LPS, LTA, IFN-β und IFN-γ mit beziehungsweise ohne L-PolyP-Costimulation. Die BMDM wurden jeweils für 24 Stunden mit den jeweiligen Agonisten stimuliert und die Cytokinkonzentration im zellfreien Überstand mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind Daten eines repräsentativen, unabhängigen Experiments von n = 3 Experimenten unter Angabe von Mittelwert und Standardfehler. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels ANOVA. Folgende Signifikanzniveaus sind angegeben: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, n.s.: p>0.05. IL-27: Interleukin-27, LPS: Lipopolysaccharid, LTA: Lipoteichonsäure, PF4: Platelet factor 4 (CXCL4), TMEM206: Transmembrane protein 206, Wt: Wildtyp (C57BL6/J)

4.3.6. Studien zum Einfluss von TMEM206 auf STAT-Signalgebung und die Expression von MHC-II und costimulatorischen Molekülen

Da STAT3 und MHC-II bekannte, Interaktionspartner von hTMEM206 sind, wurde abschließend noch der Einfluss des TMEM206-Verlusts auf die STAT3-Signalgebung und MHC-II Expression untersucht. Hierzu wurden zum einen Splenozyten der Maus isoliert, mit bekannten STAT-Induktoren für 45 min stimuliert und anschließend der Phosphorylierungszustand von STAT3 durchflusszytometrisch bestimmt. Hierbei konnte jedoch kein Einfluss von TMEM206 auf die Phosphorylierung von STAT3 nach IL-6-Stimulation festgestellt werden (Abb. 30).

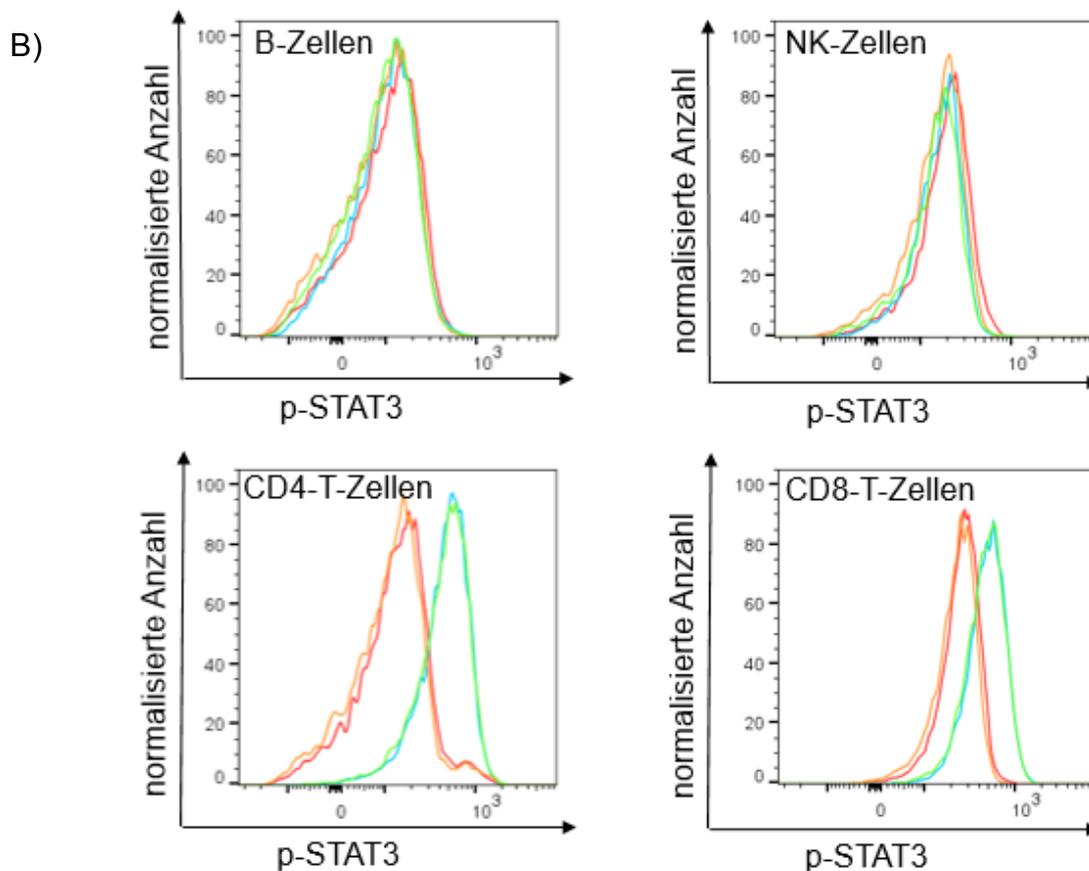
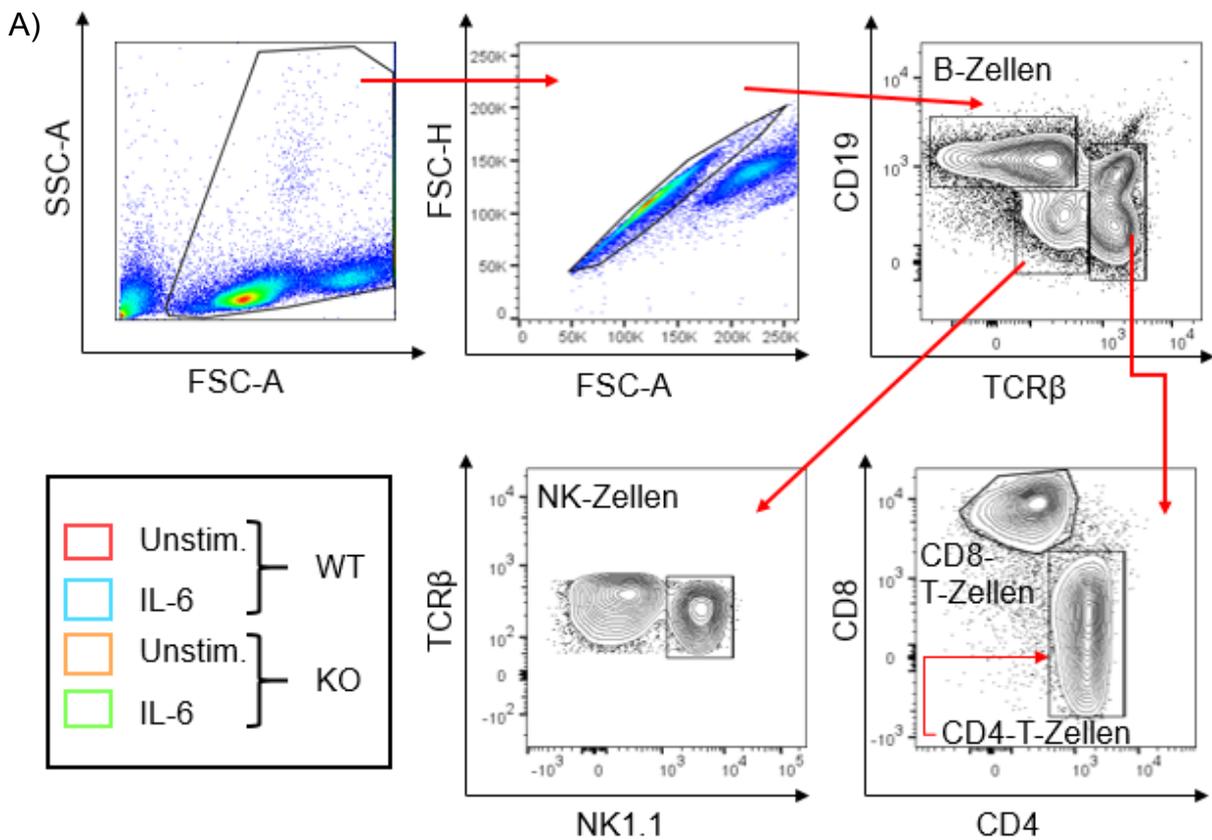


Abb. 30: Untersuchung der STAT3(Y705)-Phosphorylierung in Splenozyten. Milzen von TMEM206^{-/-} und Wildtyp-Tieren wurden isoliert, eine Einzelzellsuspension erstellt und die Zellen zur Induktion von STAT3-Phosphorylierung mit IL-6 für 45 min stimuliert. Die so behandelten Zellen, sowie unstimulierte Kontrollen wurden gegen typische Oberflächenantigene von B-, NK- und T-Zellen gefärbt und hinsichtlich der Menge phosphorylierten STAT3(Y705) untersucht.

Fortsetzung Abb. 30:

A) *Gating* Strategie. Die Zellpopulationen wurden über Vorwärts (FSC)- und Seitwärtsstreuung (SSC) identifiziert und bezüglich Einzelzellen *gated* (FSC-H gegen FSC-A). B-Zellen wurden anhand ihrer CD19-Expression und T-Zellen über die TCR β -Kette identifiziert. Nicht als T- oder B-Zellen identifizierte Zellen wurden bezüglich ihrer Expression von NK1.1 untersucht, NK-Zellen wurden als NK1.1-positive Zellen identifiziert. Identifizierte T-Zellen wurden abschließend bezüglich ihrer CD4 beziehungsweise CD8-Expression *gated*. B) STAT3-Phosphorylierung in den verschiedenen Zelltypen der Milz. Gezeigt sind repräsentative Daten eines unabhängigen Experiments von insgesamt n = 3 durchgeführten Experimenten.

FSC: Vorwärtsstreulicht, IL-6: Interleukin-6, KO: Knock-out, NK-Zellen: Natürliche Killer-Zellen, SSC: Seitwärtsstreulicht, STAT3: *Signal transducer and activator of transcription 3*, WT: Wildtyp, Unstim.: Unstimuliert

Wie Abb. 30 zeigt, wurde deutliche IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung nur in T-Zellen beobachtet. B- und NK-Zellen verhielten sich weitgehend unresponsiv gegenüber dem Stimulus. Signifikante Unterschiede in der basalen sowie der IL-6-induzierten STAT3-Phosphorylierung zwischen den Genotypen (TMEM206^{-/-} gegenüber Wildtyp) konnten nicht beobachtet werden.

Zusätzlich zur STAT-Phosphorylierung wurde die Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 in BMDM in Abhängigkeit vom TMEM206-Genotyp auf RNA- und Proteinebene untersucht (Abb. 31). Hierfür wurden BMDM mit LPS stimuliert und nach der zuvor durch eine Kinetik ermittelten, optimalen Inkubationszeit hinsichtlich der Expression des Markers untersucht. Für die Untersuchung auf RNA-Ebene wurden die Zellen nach 3 h (CD80) beziehungsweise 10 h (CD86) Inkubationszeit lysiert, die RNA extrahiert und mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese cDNA wurde im Rahmen quantitativer *Real-time* PCR (qPCR) eingesetzt. Hierbei konnte eine signifikant, auf etwa die Hälfte des im Wildtyp gefundenen und auf 1,0 normierten Wertes, verringerte Transkriptmenge für CD80 und CD86 nach LPS-Stimulation im TMEM206-Knock-out gegenüber Wildtyp-Zellen beobachtet werden (Abb 31 A und B). Um die festgestellten Unterschiede in der CD80/CD86-Expression auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurden BMDM mit LPS stimuliert und nach 24 h durchflusszytometrisch bezüglich der Oberflächenexpression der Marker untersucht. Hierbei konnten die auf RNA-Ebene gefundenen, signifikanten Unterschiede nicht bestätigt werden. Für CD86 zeigten sich allenfalls marginale Unterschiede (Abb. 31 C), für CD80 war kein deutlicher Unterschied beobachtbar (Abb. 31 D).

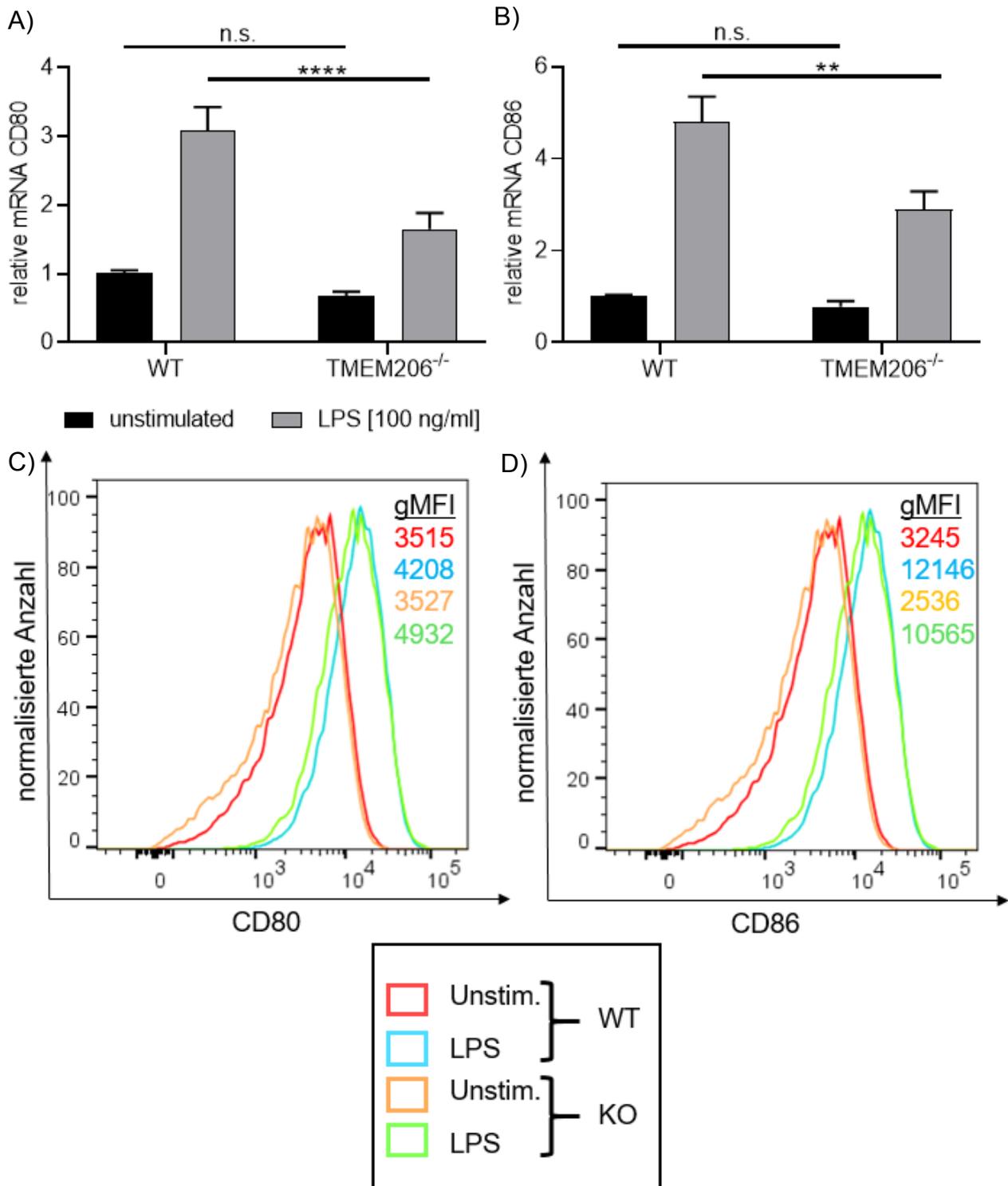


Abb. 31: Untersuchung von CD80- und CD86-Expression in BMDM. A und B) Expression von CD80 und CD86 auf Transkriptebene. Expression von CD80 und CD86 in TMEM206^{-/-} und C57BL/6J-Kontroll-BMDM wurde mittels quantitativer PCR auf RNA-Ebene untersucht. Zur Induktion von CD80 und CD86 wurde mit LPS für 3 h (CD80) beziehungsweise 10 h (CD86) stimuliert. Statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA, folgende Signifikanzniveaus werden angegeben: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, ns: p>0.05

C und D) CD80 und CD86 auf Proteinebene. Hierfür wurden BMDM mit LPS für 24 h stimuliert, gegen die Oberflächenantigene CD11b und F4/80 gefärbt und die doppelpositive Lebendzellpopulation nach *gating* auf Einzelzellen hinsichtlich der CD80 und CD86-Expression untersucht. Das *Gating* der BMDM erfolgte analog zu der in Abb. 27 gezeigten Strategie. CD: Cluster of Differentiation, KO: Knock-out, LPS: Lipopolysaccharid, Unstim: unstimuliert, WT: Wildtyp

4.4. TMCO1

4.4.1. TMCO1 bindet L-PolyP und seine Genexpression wird durch LPS moduliert

TMCO1 wurde als Transmembranprotein mit Lokalisation in der Membran des endoplasmatischen Retikulums identifiziert (Wang et al., 2016). In der Literatur wurde für das Protein eine Funktion in der Homöostase der endoplasmatischen Calcium-Konzentration beschrieben. Humane TMCO1-Gendefekte wurden unter anderem mit Skelettanomalien, craniofacialem Dymorphismus, mentaler Retardation und Ataxie, assoziiert (Wang et al., 2016). Immunologisch ist TMCO1 aufgrund seiner starken Herabregulation unter LPS-Stimulation sowie der starken Bindung von L-PolyP interessant. Transkriptomanalysen unserer Gruppe haben gezeigt, dass unter LPS-Stimulation die Expression von TMCO1 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle um etwa die Hälfte reduziert ist. Die Stärke der Repression wird durch L-PolyP moduliert, während L-PolyP allein keinen Effekt auf die TMCO1-Expression hat. In Bindungsexperimenten mit Mikropartikel-gekoppeltem L-PolyP konnte TMCO1 etwa zweifach gegenüber der Kontrolle ohne L-PolyP angereichert werden (Abb. 32).

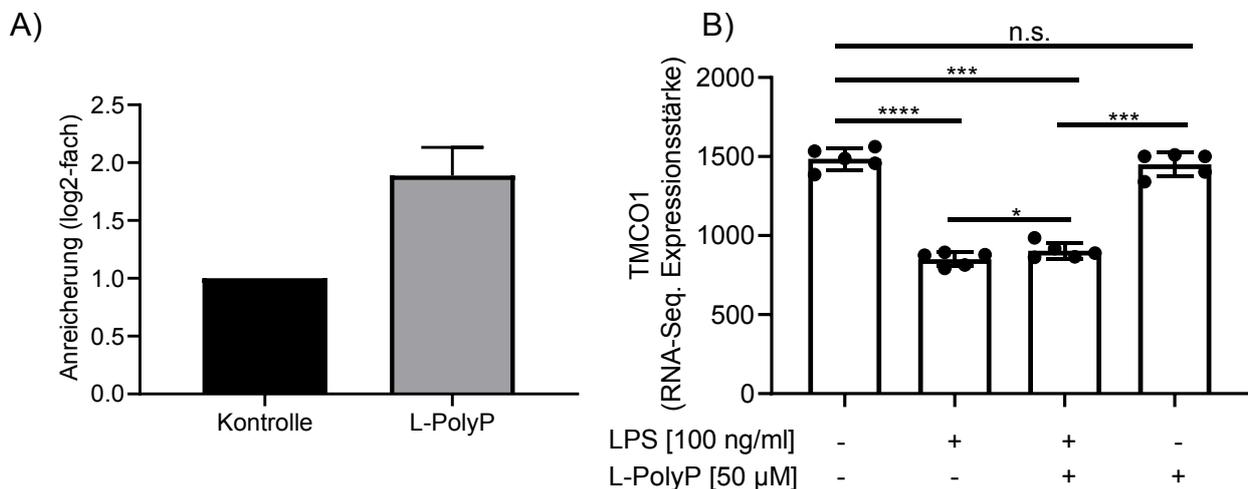


Abb. 32: Expression von TMCO1 in BMDM sowie Anreicherung von TMCO1 an L-PolyP.

A) Bindung von TMCO1 an L-PolyP und massenspektrometrische Identifizierung. Gesamtzelllysate von B6J-BMDM wurden hergestellt und mit Mikropartikel-gebundenem L-PolyP inkubiert. Gebundenes TMCO1 wurde massenspektrometrisch identifiziert. B) Expression von TMCO1 wurde auf Transkriptebene mittels RNA-Seq. in BMDM bestimmt. Während L-PolyP keinen Effekt auf TMCO1-Expression zeigt, ist TMCO1 nach 12-stündiger LPS-Stimulation signifikant herunterreguliert. L-PolyP mildert die beobachtete Herunterregulation von TMCO1 etwas ab. $n = 5$ Tiere pro Gruppe, statistische Analyse mittels gepaartem t-Test, Signifikanzniveaus: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns: $p > 0.05$.

L-PolyP: langkettiges Polyphosphat, LPS: Lipopolysaccharid, TMCO1: *Transmembrane and coiled-coil domain 1*

4.4.2. TMCO1^{-/-} Mäuse sind subfertil und subviabel

Für die TMCO1-Zucht wurde seitens des konventionellen Züchters, von dem die Tiere erworben wurden, berichtet, dass es sich um einen subfertilen und subviablen Stamm handelt. In der heterozygoten Verpaarung wurden etwa 7 % tote Tiere erhalten, die in der Regel vor dem Erreichen des Absetzalters von drei Wochen, verstarben. Die homozygote Verpaarung von Tieren des Stamms erwies sich auch in unserer Zucht als erfolglos. Dementsprechend wurden die Tiere heterozygot verpaart und eine Statistik über die

Zuchtergebnisse geführt (Abb. 33). Während der Zucht wurden etwa 51 % Männchen und 49 % Weibchen erhalten. Dies entspricht einer Geschlechterverteilung von annähernd 1:1. Die einzelnen Genotypen wurden für die beiden Geschlechter separat aufgeschlüsselt. Männliche Nachkommen waren zu etwa 72 % heterozygot, zu 24 % Wildtyp und 6 % homozygot. Im Vergleich dazu wurde für weibliche Nachkommen eine Verteilung von 64 % heterozygoten, 4 % homozygoten und 32 % Wildtyp Tieren erhalten. Der Anteil heterozygoter und homozygoter Tiere ist damit gegenüber den männlichen Nachkommen reduziert, der von Wildtyp-Tieren hingegen erhöht.

TMCO1 het x het 111						
Genotyp	wt	het	hom	tot		
Anzahl	30	68	5	8		
Anteil	27 %	61.3 %	4.5 %	7.2 %		
Verhältnisse ohne tote Tiere	♂ 53 51.5 %				♀ 50 48.5 %	
	wt	het	hom	wt	het	hom
	12	28	3	16	32	2
	23.5 %	71.7 %	5.7 %	32 %	64 %	4 %

Abb. 33: Zuchtstatistik für die heterozygote TMCO1-Zucht. TMCO1-Knock-out-Tiere wurden heterozygot verpaart und die Genotypen der Nachkommen mittels PCR bestimmt. Die absoluten und relativen Anteile toter, homozygoter, heterozygoter sowie Wildtyp-Tiere an der Gesamtanzahl der Nachkommen wurden bestimmt. Die toten Tiere verstarben bereits vor Erreichen des Absetzalters von drei Wochen. Das Geschlechterverhältnis für die lebenden Tiere wurde bestimmt sowie die erhaltenen Genotypen nach Geschlecht aufgeschlüsselt. Für die Berechnung der Geschlechteranteile und relativen Häufigkeitsverteilungen der Genotypen wurden die vorzeitig verstorbenen Tiere exkludiert.

het: heterozygot, hom: homozygot, wt: Wildtyp (C57BL6/J), TMCO1: *Transmembrane and coiled-coil domain 1*.

4.4.3. TMCO1 moduliert die inflammatorische Cytokinantwort *in vivo*

Die Funktion von TMCO1 in der Entzündungsantwort wurde mittels Endotoxämiemodell im Folgenden näher untersucht. Dazu wurden aufgrund der geringen Anzahl erhaltener, homozygoter Nachkommen, zunächst Knochenmarkschimären generiert. Hierfür wurden die Akzeptortiere zunächst bestrahlt und dann aus TMCO1-Knock-out-Mäusen isoliertes Knochenmark intravenös appliziert. Der Kontrollgruppe wurde Knochenmark von C57BL6/NJ-Tieren transferiert. Nach einer Ruhephase von sechs Wochen unter SPF-Bedingungen wurde die Endotoxämie in den Tieren durch intraperitoneale Applikation von LPS induziert (Abb. 34 A). Die Tiere wurden nachfolgend bezüglich des sich entwickelnden klinischen Schweregrads der Erkrankung beobachtet. Nach 10 h wurde ein signifikanter Unterschied im Schweregrad zwischen den Gruppen beobachtet. Der Schweregrad war dabei in der TMCO1^{-/-}-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe (Abb.34 B). Zum 10 h-Zeitpunkt isoliertes Blutplasma wurde mittels Mikropartikel-basiertem Multiplexassay bezüglich der Plasmakonzentration von Cytokinen und Chemokinen untersucht (Abb. 34 C). Hierbei wurde ein signifikanter Unterschied zwischen TMCO1^{-/-} und C57BL6/NJ-Kontrollgruppe für MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und IL-10 beobachtet. Die

Plasmakonzentration dieser Cytokine war in $TMCO1^{-/-}$ -Tieren signifikant erhöht. Die Werte für MIP-1 α waren im Knock-out etwa vierfach, für MIP-1 β etwa dreifach, für RANTES etwa anderthalbfach und für IL-10 etwa um das zehnfache, erhöht.

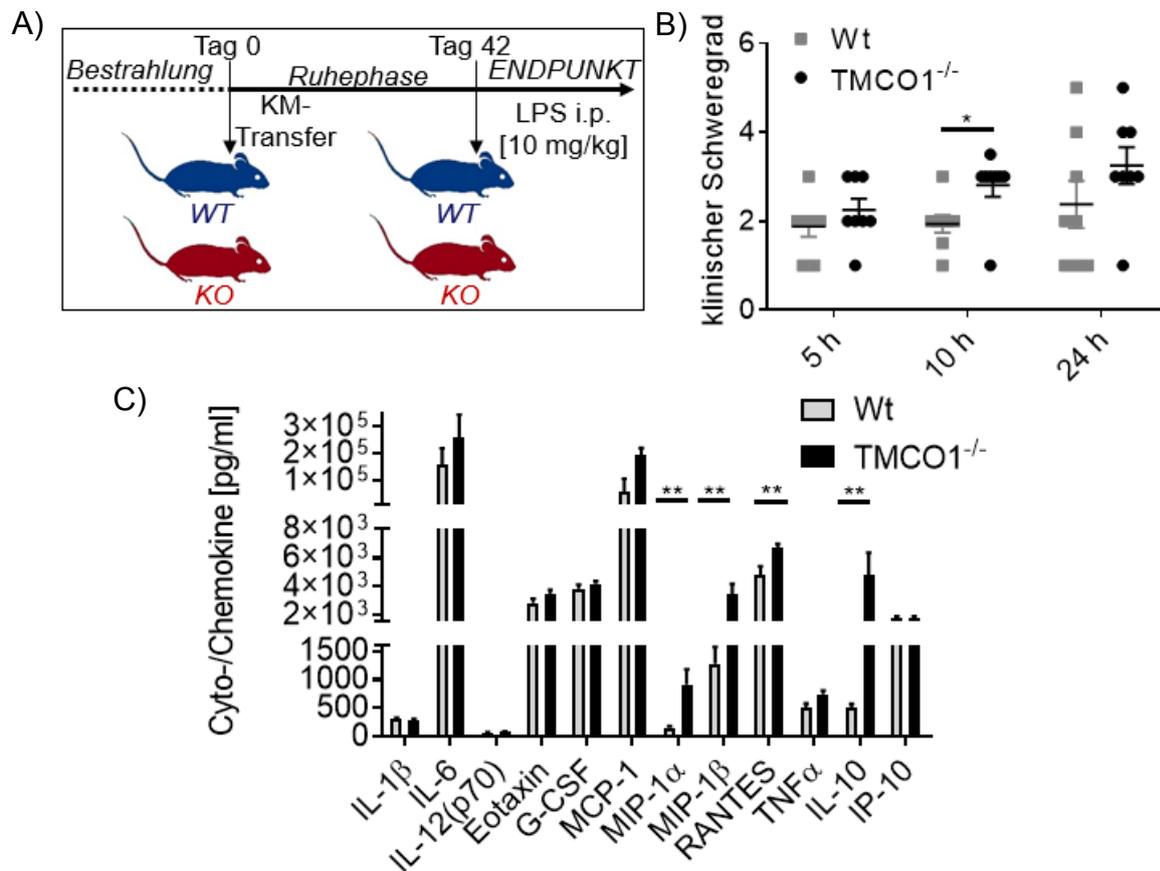


Abb. 34: Endotoxämie mit chimären $TMCO1$ -Knock-out Mäusen. A) Generierung von Knochenmarkschimären. B6N-Tieren ($n = 8$ pro Gruppe) wurde nach Bestrahlung Knochenmark von $TMCO1^{-/-}$ beziehungsweise C57BL6/NJ ($n = 2$ Spendertiere) als Kontrollgruppe transferiert. Die Tiere wurden nach Knochenmarkstransfer für sechs Wochen unter SPF-Bedingungen gehalten, bevor durch intraperitoneale Applikation von LPS die Endotoxämie induziert wurde. B) Bestimmung des klinischen Schweregrads (CSS) der Tiere nach Gonnert et al. (2011) unter Beobachtung nach Endotoxämie. Zum 10 h- Zeitpunkt ergibt sich ein schwach signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit einem höheren Schweregrad bei $TMCO1$ -Knock-out Tieren. C) Multiplex-Analyse von Plasma-Cytokinen. Partikel-basierte, absolute Quantifizierung von Cytokinen und Chemokinen im zum 10 h-Zeitpunkt gewonnenem Plasma. Signifikante Unterschiede in den Cytokinkonzentrationen von $TMCO1^{-/-}$ und Kontrollgruppe wurden für MIP1 α , MIP1 β , RANTES und IL-10 beobachtet. Diese Cytokine sind in $TMCO1^{-/-}$ Tieren nach Endotoxämie signifikant erhöht. Darstellung von Mittelwert und Standardfehler. Statistische Analyse der Daten erfolgte mittels ANOVA unter Angabe der Signifikanzniveaus: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns: $p > 0.05$.

G-CSF, KM-Transfer: Knochenmark-Transfer, IL: Interleukin, IP-10: *Interferon gamma-induced protein 10* (CXCL10), LPS: Lipopolysaccharid, MCP1: *Monocyte chemoattractant protein 1*, MIP-1: *Macrophage Inflammatory Protein*, TNF α : Tumornekrosefaktor α .

Neben der Bewertung der Tiere anhand der Definitionen des klinischen Schweregrads, sowie der Plasmacytokine wurden auch die Zellpopulationen im Peritoneum untersucht. Dafür wurden die Tiere nach 24 h Beobachtungszeit euthanasiert und das Peritoneum zur Isolation der Zellen gespült. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD11b und F4/80 (Makrophagen) sowie Ly6G (Neutrophile) gefärbt. Anhand der durchflusszytometrisch erhaltenen Populationen wurde mittels Zählpartikeln die absolute Häufigkeit von Makrophagen und Neutrophilen pro Peritoneum bestimmt. Für das *Gating* (Abb. 35) wurden zunächst Einzel- und

Lebendzellpopulationen identifiziert. Ausgehend von der Lebendzellpopulation wurden Makrophagen als CD11b⁺ und F4/80⁺ Zellen identifiziert. Neutrophile wurden als CD11b^{mittel} und Ly6G⁺ Zellpopulation identifiziert.

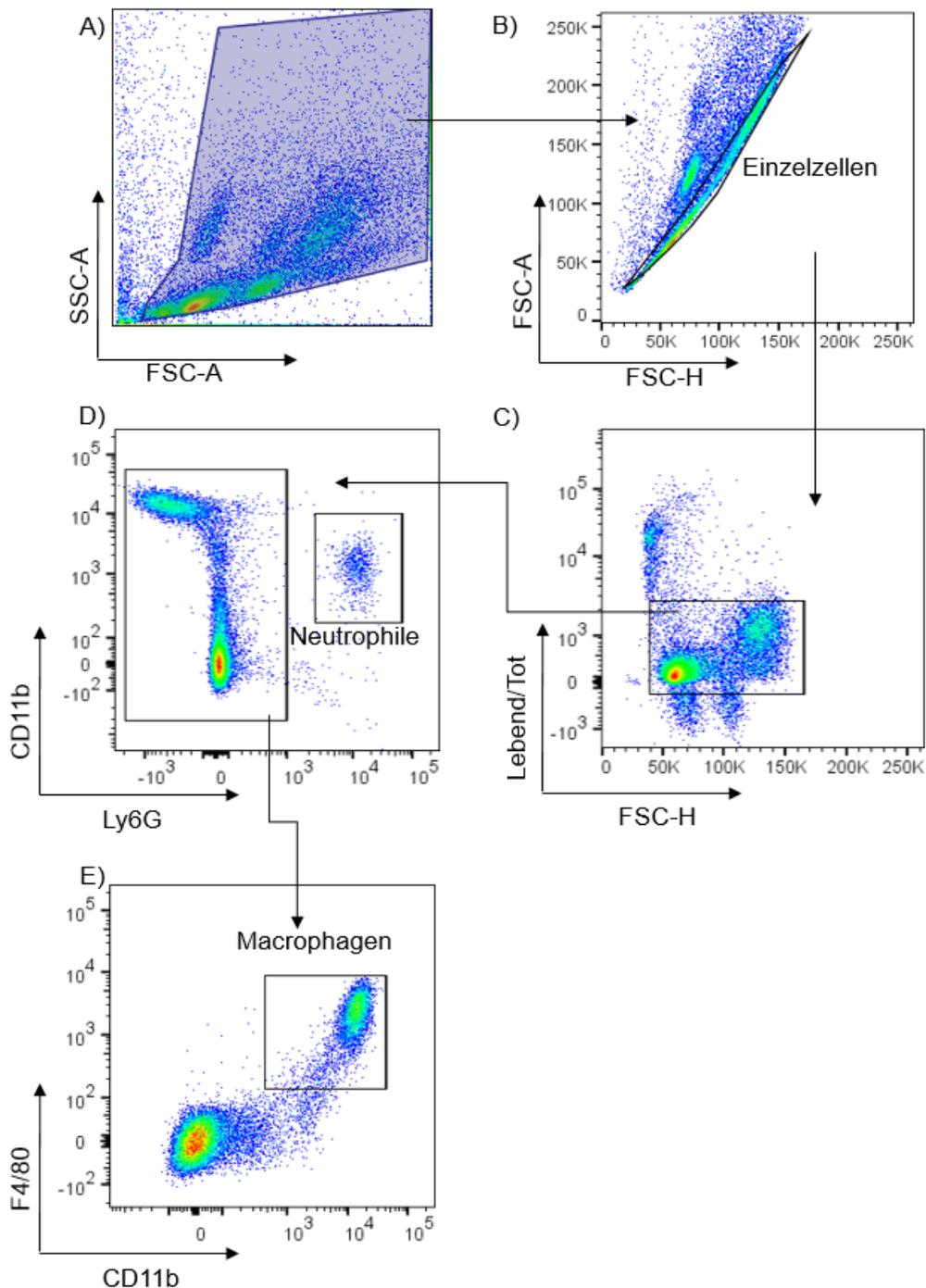


Abb. 35: Gating-Strategie für Zellpopulationen der Peritoneallavage nach Endotoxämie. Zum Ende des Beobachtungszeitraums nach 24 h wurden die Experimentaltiere getötet und die Peritonealhöhle gespült. Die absolute Anzahl an Neutrophilen und Makrophagen wurde durch FACS-Färbung unter Nutzung von Zählpartikeln, bestimmt. Dafür wurden die Zellen (A) zunächst nach Einzelzellen (B) und Lebendzellen (C) *gated*. Neutrophile wurden als Ly6G⁺/CD11b⁺ und Makrophagen als CD11b⁺ und F4/80⁺ Zellpopulationen definiert.

Bei Betrachtung der absoluten Häufigkeiten der Makrophagen- und Neutrophilenzahl 24 h nach Induktion der Endotoxämie (Abb. 36) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen. Tendenziell wurden im TMCO1-Knock-out aber

weniger eingewanderte Makrophagen beobachtet als im WT (Abb. 30 A), die Neutrophilenzahl schien hingegen tendenziell erhöht (Abb. 30 B).

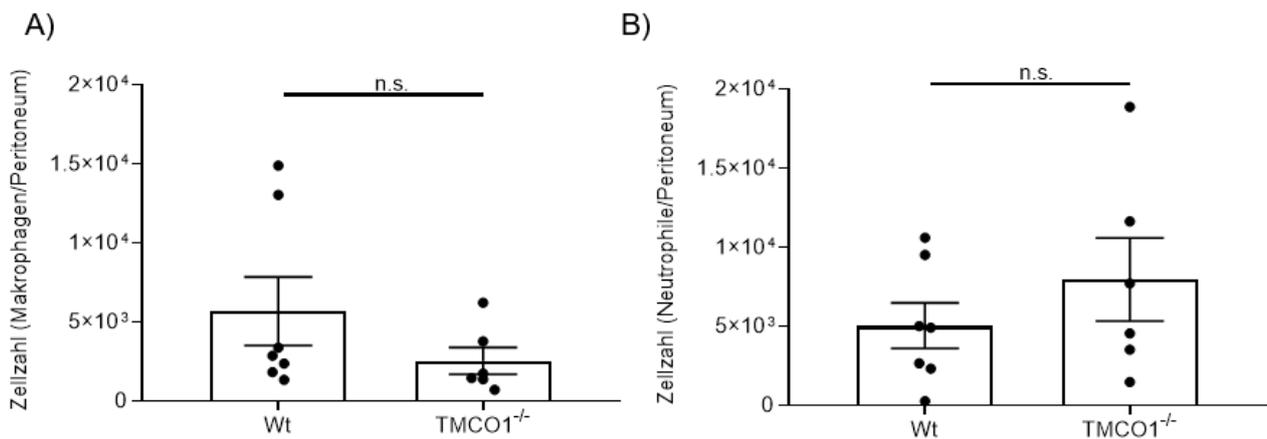


Abb. 36: Quantifizierung von Zelltypen der Peritoneallavage endotoxämischer TMCO1^{-/-} und Kontrolltiere. A) Absolute Zellzahl von Makrophagen, normalisiert auf das erhaltene Lavagevolumen. B) Absolute Zellzahl von Neutrophilen, normalisiert auf das zurückgewonnene Lavagevolumen. Die absoluten Zellzahlen wurden nach 24 h Beobachtungszeit in der Peritoneallavage FACS-basiert unter Nutzung von Zählpartikeln, ermittelt. Die Gruppengröße für TMCO1^{-/-} betrug n = 6 Tiere, für die Wildtypkontrolle n = 5 Tiere pro Gruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers. Die statistische Analyse erfolgte durch Student's t-Test und ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. n.s.: nicht signifikant (p > 0.05), TMCO1: *Transmembrane and coiled-coil domain 1*, Wt: Wildtyp (C57BL6/J).

5. Diskussion

5.1. L-PolyP

5.1.1. Die Rolle von L-PolyP bei der Modulation der Wirts-Immunantwort

L-PolyP ist ein bakterieller Metabolit, dessen intrazellulärer Auf- und Abbau auf enzymatischem Wege erfolgt und der mehrere zentrale Funktionen im bakteriellen Metabolismus wahrnehmen kann. Einerseits wurde L-PolyP so als zellulärer Energiespeicher und Phosphatgruppendonator beschrieben, andererseits aber auch als wichtiger Pathogenizitätsfaktor pro- und eukaryotischer Pathogene (Achbergerova & Nahalka, 2011; Wang et al., 2018). Aufgrund seiner stark negativen Ladung liegt es nahe, dass L-PolyP an eine Vielzahl positiv geladener Proteinstrukturen, wie beispielsweise Rezeptoren und Histone binden kann. In Partikel-basierten Bindungsstudien mit Gesamtzelllysaten von BMDM konnte, durch bioinformatische Analyse bereits in unserer Arbeitsgruppe vorliegender Massenspektrometrie-Daten, eine Vielzahl Proteine identifiziert werden (Röwe, 2018). Da L-PolyP im Rahmen einer bakteriellen Infektion zusammen mit LPS (gram-negative Bakterien) beziehungsweise LTA (gram-positive Bakterien) an der Infektionsstelle vorliegt, wurde im Folgenden der Einfluss von L-PolyP auf die Induktion der angeborenen Immunabwehr untersucht. Dafür wurde einerseits die Cytokinfreisetzung nach Stimulation mit den TLR-Agonisten LPS, LTA, Peptidoglycan, Zymosan und Mannan jeweils in Gegenwart und Abwesenheit von L-PolyP untersucht. Andererseits wurde der Einfluss auf die Antigenpräsentation mittels quantitativer *real-time* PCR (qPCR) untersucht. Auf Proteinebene wurden zunächst die *in vitro* freigesetzten Konzentrationen an IL-27(p28) und PF4 im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen. Dabei zeigte sich, dass LPS unter den verwendeten Stimuli die stärkste IL-27 Induktion zur Folge hatte (Abb. 7 A). Die durch Zymosan und LTA induzierten Antworten sind hingegen deutlich schwächer als die Antwort auf den LPS-Stimulus und bezüglich ihrer Stärke miteinander in etwa vergleichbar. Peptidoglycan induziert eine relativ schwache Antwort, während Mannan keinen nennbaren Effekt auf die IL-27-Induktion aufweist. Bei Betrachtung der PF4-Sekretion fällt auf, dass L-PolyP-Stimulation allein bereits eine PF4-Antwort induziert (Abb. 7B). Im Zusammenspiel mit LPS wird dieser Effekt synergistisch um ein Vielfaches verstärkt und liefert so den stärksten Reiz unter den verwendeten Stimulantien. Die PF4-Induktion durch die anderen Stimulantien wird durch L-PolyP ebenfalls jeweils signifikant verstärkt.

Die unterschiedlich starken Effekte der verwendeten Agonisten können vermutlich auf die zelluläre Signalgebung zurückgeführt werden. Während Peptidoglycan, Zymosan und LTA den TLR-2 aktivieren, bindet und aktiviert LPS an den TLR-4 (Kawasaki & Kawai, 2014). Eine starke und schnelle Reaktion auf bakterielle Pathogene ist aufgrund der im Vergleich mit beispielsweise Pilzzellen oftmals sehr kurzen Generationszeiten, physiologisch und evolutionär vorteilhaft. Dafür ist die Induktion einer kompetenten und starken Immunantwort am Infektionsort vonnöten. TLR4 kann dazu über zwei verschiedene Signalwege zelluläre Reaktionen auslösen: Erstens über den MyD88-abhängigen Weg, unter Beteiligung von IRAK-Kinasen und TRAF6 mit dem Zieltranskriptionsfaktor NF- κ B. Zweitens über den TRIF-abhängigen Weg mit Aktivierung von IRF3. Während der schnellere Signalweg über MyD88 als Reaktion der „frühen Phase“ verstanden werden kann, führt der TRIF-abhängige Weg verzögert („späte Phase“) zur NF- κ B und AP-1 Aktivierung (Buchanan et al., 2010; Okada & Suzuki, 2017). Sowohl NF- κ B als auch IRF3 induzieren die Typ I-Interferon und Cytokinantwort, die die zellbasierte Elimination der Mikroorganismen einleiten (Kawasaki & Kawai, 2014).

Zusätzlich zur Cytokinsekretion wurde auch die Antigenpräsentation untersucht. Dafür wurden mittels quantitativer PCR die Transkriptlevel von *TAP1*, *Irg1* sowie der für die T-Zell-Aktivierung wichtigen, costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 untersucht. *TAP1* (*transporter associated with antigen processing*) katalysiert den Transport cytosolischer Peptide in das ER-Lumen. Hier erfolgt die anschließende Beladung von MHC-I Molekülen mit den transportierten Peptiden (Procko et al., 2006). CD80 und CD86 fungieren als costimulatorische Moleküle auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen. Für die Aktivierung von T-Zellen ist nicht nur die Bindung des Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptors an einen Antigen:MHC-Komplex, sondern auch die Bindung des CD28-Rezeptors an CD80/CD86 entscheidend (Vasilevko et al., 2002). Während *TAP1* durch LPS stark induziert wird, zeigt sich unter Co-Stimulation mit L-PolyP hier eine signifikante Herunterregulation der LPS-induzierten *TAP1* Expression (Abb. 8 A). *CD80* und *CD86* werden durch LPS ebenfalls stark induziert (Marim et al., 2010). Mit L-PolyP zeigt sich eine Tendenz Richtung Inhibition (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde und der Umstand, dass L-PolyP zusätzlich die iNOS-Induktion inhibiert (Harada et al., 2013) sprechen dafür, dass L-PolyP die Makrophagen-basierte, angeborene Immunreaktion gegenüber bakteriellen Pathogenen sowie die entsprechenden zellulären Effektorfunktionen herabsetzt. Ebenfalls stark durch LPS induziert wird die Expression des Gens *Irg1*. L-PolyP zeigte hier einen inhibitorischen Effekt gegenüber der LPS-induzierten Genexpression (Abb. 8 B). Die starke Heraufregulation der Expression dieses Gens unter inflammatorischen Bedingungen ist aus der Literatur bereits bekannt (Tangsudjai et al., 2009; Degrandi et al., 2009; Uddin et al., 2016). Das Genprodukt, cis-Aconitat-Decarboxylase (ACOD), ist ein mitochondriales Enzym, das die Synthese von Itakonat aus dem Zellzyklus-Intermediat cis-Aconitat katalysiert (Uddin et al., 2016). Itakonat wurde in der Literatur insbesondere mit einer antimikrobiellen Wirkung assoziiert, die auf einer Hemmung der bakteriellen Isocitratlyase, einem Schlüsselenzyms des Glyoxylatzyklus beruht, assoziiert (Williams et al., 1971; Luan & Medzhitov, 2016). Darüber hinaus wurde Itakonat als wichtiger Modulator der inflammatorischen Reaktion beschrieben (Hooftmann & O'Neill, 2019; Mills et al., 2018). Itakonat ist dabei insbesondere für die Aktivierung des anti-inflammatorischen Transkriptionsfaktors Nrf2 in Makrophagen von besonderer Bedeutung (Mills et al., 2018). Vorbehandlung von Makrophagen mit Dimethylitakonat, einem membranpermeablen, nicht-ionischen Derivats des Itakonats, inhibiert die Produktion der Interleukine IL-6, IL-12, IL-1 β sowie reaktiver Sauerstoffspezies und NO als Antwort auf eine Vielzahl inflammatorischer Stimuli (Lampropoulou et al., 2016; Luan & Medzhitov, 2016). Es ist zusätzlich bekannt, dass *Irg1*-defiziente Makrophagen eine reduzierte antimikrobielle Aktivität aufweisen, die auf eine verminderte mitochondriale ROS-Produktion zurückgeführt werden konnte (Hall et al., 2013) Die Herunterregulation der LPS-induzierten Genexpression durch L-PolyP spricht ebenfalls für eine Inhibition der Induktion der Immunreaktion. Dies ist kongruent mit den Befunden, dass L-PolyP, vermutlich durch Herunterregulation von *TAP1*, *CD80* und *CD86*, die Antigenpräsentation und T-Zell-Costimulation und damit auch die Induktion und Verstärkung der angeborenen und adaptiven Immunreaktion, hemmt. Die Verschiebung des durch LPS induzierten inflammatorischen M1-Makrophagenphänotyps durch L-PolyP in Richtung eines eher anti-inflammatorischen M2-Phänotyps wurde bereits zuvor innerhalb unserer Gruppe beobachtet (Röwe, 2018). Dies äußert sich auch in einer Inhibition der iNOS-Induktion, über die normalerweise unter den Bedingungen einer Infektion NO synthetisiert wird, das aufgrund seines reaktiven Charakters Bakterien und andere Pathogene effizient abtötet (Xue et al., 2018).

Da *Irg1* eine wichtige Rolle in der Makrophagenfunktion und Entzündung spielt (Hall et al., 2013), wurde auch der Einfluss von Itakonat auf den Makrophagenphänotyp untersucht. Dafür wurden naive BMDM, sowie BMDM die zuvor in Richtung M1- beziehungsweise M2-Phänotyp polarisiert wurden, mit LPS und L-PolyP in Gegenwart oder Abwesenheit von Dimethylitaconat stimuliert (Abb. 9). Als Endpunktmessung nach 24 h wurden die

Konzentrationen von IL-27(p28) und PF4 im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. In Gegenwart von Dimethylitaconat war die Freisetzung von IL-27(p28) im Vergleich zu nicht behandelten Proben signifikant inhibiert. Die gemessenen Konzentrationen betragen etwa ein Fünftel der ohne DI gemessenen Konzentration (Abb. 9 A). Dies ist für alle untersuchten Phänotypen der Fall. Auch in Gegenwart von Dimethylitaconat zeigt L-PolyP eine Inhibition der IL-27(p28)-Freisetzung. Dies ist kongruent mit den Befunden von Lamprapoulou et al., die von einer Inhibition der Produktion von IL-6, IL-12(p70) und IL-1 β in durch mit Itakonat vorbehandelten Makrophagen berichten (Lamprapoulou et al., 2016).

Für PF4 wird hingegen eine Induktion durch DI beobachtet (Abb. 9 B). Die nach Stimulation mit LPS beziehungsweise L-PolyP gemessenen PF4 Konzentrationen sind in Gegenwart von DI um etwa das dreifache erhöht. Signifikante Unterschiede zwischen den Bedingungen werden jedoch nur für mit LPS und L-PolyP costimulierte Proben erhalten. Hier sind die unter DI-Gegenwart erhaltenen PF4-Konzentrationen gegenüber den nicht mit DI behandelten Proben signifikant erhöht. Darüber hinaus ist ersichtlich, dass lediglich M0 Makrophagen deutlich auf die Stimulation mit LPS und PolyP mit PF4-Sekretion reagieren. Sowohl M1- als auch M2-Phänotyp reagieren im Vergleich dazu kaum. Die geringere Responsivität der in Richtung M1 beziehungsweise M2 polarisierten Makrophagen kann möglicherweise durch das *priming* des Makrophagenmetabolismus erklärt werden. Durch die bereits vorher eingetretene, starke Aktivierung fällt die Immunantwort auf den zweiten immunologischen Stimulus in der Folge deutlich schwächer aus. Auch möglich ist, dass auf zellulärer Ebene bereits Kompensationsmechanismen wie die Herunterregulation von Oberflächenrezeptoren erfolgt sind, um den Umfang der ausgelösten Immunreaktion in einer Art *feedback-loop* zu limitieren. Trotz der hier beobachteten, durch Dimethylitaconat vermittelten, zellulären Effekte, ist die Nutzung von DI als membranpermeabler Ersatz für intrazelluläres Itakonat, kritisch zu bewerten. Untersuchungen haben gezeigt, dass aus dem Extrazellulärraum aufgenommenes DI intrazellulär nicht zu Itakonat verstoffwechselt wird (ElAzzouny et al., 2017). Aktuelle Studien verwenden deshalb 4-Octylitaconat als neues, zellpermeables Itakonatderivat (Mills et al., 2018). In zukünftigen Versuchen sollte noch einmal überprüft werden, ob mit 4-Octylitaconat analoge Effekte in BMDM beobachtet werden.

5.1.2. Therapeutisches Potenzial der enzymatischen Degradation von L-PolyP

Um die Effekte von L-PolyP auch *in vivo*, im Rahmen einer systemischen Immunreaktion, zu untersuchen, wurde auf das chirurgische Sepsismodell der CLP zurückgegriffen. Hierbei wird das Peritoneum eröffnet, das Caecum vorgelagert, ligiert und mit einer Kanüle punktiert. Eine kleine Menge Darminhalt wird durch leichten Druck extrudiert und das Caecum anschließend in die Bauchhöhle reponiert. Hierdurch kommt es zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis (Toscano et al., 2011). Bei dieser Methode lässt sich der Schweregrad der Sepsis relativ gut über den Anteil ligierten Caecums und der Menge extrudierten Stuhls titrieren. Im Rahmen der CLP-induzierten Sepsis wurde der therapeutische Effekt des enzymatischen Verdaus von L-PolyP durch rekombinante Exopolyphosphatase untersucht. Dafür wurde PPX der Hefe *Saccharomyces cerevisia* (ScPPX) in *E. coli* rekombinant exprimiert und mittels Affinitätschromatographie über Bindung des His₆-Tags an eine Ni-NTA-Säule aus dem Zellysat gereinigt. Die Reinheit des Enzyms wurde mittels PAGE untersucht und die Konzentration des gewonnenen Proteins bestimmt. Die Aktivität des Enzyms wurde durch Verdau von L-PolyP und Quantifizierung des freigesetzten Monophosphats einerseits und Anwendung in der Zellkultur andererseits, verifiziert. Im Rahmen der Aktivitätstestung konnte eine mittlere Aktivität der verwendeten Fraktion von 19,6 nmol/(min·mg PPX) bestimmt werden. Die Gesamtmenge des aus einem Liter Suspensionskultur erhaltenen Zielproteins betrug etwa 4 mg. In der Literatur wurden bereits höhere Ausbeuten von mehr als 5 mg PPX pro Liter Suspensionskultur berichtet

(Pokhrel et al., 2019). Die Differenzen können jedoch durch unterschiedliche Wachstumsbedingungen, verschieden effektive Lyseprotokolle und experimentelle Schwankungen während der Chromatographie (Säulenkapazität, Flussgeschwindigkeit, Temperatur, Proteaseaktivität) bedingt sein. Beispielsweise erfolgte die Expression im hier vorliegenden Protokoll über Nacht. Dies ermöglicht auch längere Wirkzeiten sekretierter oder lytisch freigesetzter, zellulärer Proteasen. Die Aktivität des aufgereinigten Proteins konnte auch *in vitro* anhand der Effektivität des PPX-Verdaus gezeigt werden (Abb. 11 A). Dafür wurde L-PolyP über Nacht mithilfe des Enzyms vollständig verdaut und BMDMs anschließend vergleichend mit unverdaulichem sowie dem verdauten L-PolyP stimuliert. Hierbei zeigte sich die Effektivität des Verdaus durch die fehlende Inhibition der LPS-induzierten IL-27(p28) Sekretion. Eine leichte IL-27(p28) Induktion durch alleinige Stimulation mit PPX konnte hierbei festgestellt werden. Diese ist vermutlich auf eine geringe Endotoxinkontamination des gereinigten Proteins zurückzuführen. Der Endotoxingehalt nach chromatografischer Reinigung an einer neuen Säule wurde auf 0,14 EU/ml bestimmt, entsprechend etwa 14 - 28 pg/ml Endotoxin. Die maximale, für intravenöse Applikation noch als sicher betrachtete, Endotoxindosis beträgt 0,1 EU über den Applikationszeitraum einer Stunde (McIntyre & Reinin, 2009). Die nach Aufreinigung erhaltene Endotoxinkontamination, insbesondere nach Verdünnung des Proteins auf die Zielkonzentration, ist damit als gering zu bewerten. In den Zellkulturmodellen wurde beispielsweise standardmäßig mit der um ein Vielfaches höheren Konzentration von 100 ng/ml stimuliert. Im Rahmen nachfolgender Proteinreinigungen wurde beobachtet, dass sich der Endotoxingehalt durch mehrmalige Benutzung der Säule und vermutlich Elution des unspezifisch an das Säulenmaterial gebundenen LPS, erhöhen kann. Dies zeigte sich vor allem nach Durchführung mehrerer Reinigungen mit einer Chromatographiesäule anhand einer steigenden IL-27(p28) Induktion durch die getesteten Elutionsfraktionen. In der Folge wurden die betroffenen Proteinfraktionen nachfolgend mit Hilfe eines Endotoxin-Entfernungskits behandelt, bevor sie *in vitro* oder *in vivo* eingesetzt wurden.

Um den Einfluss des PolyP-Verdaus im Rahmen der Sepsis zu testen, wurde das CLP-Modell genutzt. Den Tieren der Experimentalgruppe wurde drei Stunden nach Durchführung der CLP ScPPX intraperitoneal appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt entsprechend das gleiche Volumen steriler Natriumchloridlösung. Im *in vivo* Modell der CLP konnte bereits mit einmaliger, postoperativer PPX-Behandlung eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate gegenüber der Kontrollgruppe innerhalb des Beobachtungszeitraums von 8 Tagen beobachtet werden (Abb. 11). Dabei starben etwa 70 % der unbehandelten Wildtyp-Tiere, jedoch nur 30 % der behandelten Individuen innerhalb des Beobachtungszeitraums. Außerdem interessant ist der Befund, dass die mit PPX behandelten Tiere erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt verstarben. Hingegen verstarb eine Vielzahl der unbehandelten Tiere bereits innerhalb der ersten 72 Stunden. Im Zusammenhang mit einer möglichen Therapie drängen sich hierbei mehrere Fragestellungen auf, die mit zukünftigen Experimenten adressiert werden sollten. Zunächst einmal ist der Wirkmechanismus der PPX-Behandlung noch weitgehend unklar. Da die Gabe von PPX nur einmalig, drei Stunden nach Sepsis-Induktion mittels CLP, erfolgte, liegt die Wirkung vermutlich in der Modulation der Induktion der durch Feces-Mikroorganismen induzierten angeborenen Immunreaktion. Bezüglich Blut- und Lavage-KBUs konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede gefunden werden (Abb. 11). Auch die in der Lavage gefundenen Makrophagenzahlen sind nicht signifikant unterschiedlich. Lediglich für die Anzahl der Neutrophilen wurden gegenüber nicht therapierten Tieren, signifikant erhöhte Werte nach PPX-Behandlung erhalten. Bei Analyse der MHC-II und iNOS-Expression in Makrophagen konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Es ist jedoch zu vermuten, dass die initiale Beseitigung der bakteriellen Erreger durch Makrophagen und Neutrophile am Infektionsort nach PPX-Behandlung verbessert ist,

wodurch der Schweregrad der induzierten, systemischen Immunreaktion reduziert ist. Für diese Theorie sprechen würde auch der Umstand, dass unbehandelte Tiere bereits innerhalb der ersten 72 h versterben, was vermutlich auf die Aktivierung der angeborenen Immunität zurückzuführen ist. Behandelte Tiere überstehen diese Phase hingegen deutlich besser. Eine umfangreiche, adaptive Immunantwort wird im Regelfall erst nach vier bis sieben Tagen effektiv (Janeway, Immunobiology, 5th ed.). Möglicherweise könnte die PPX-Behandlung demnach helfen, diese Zeitspanne effektiv zu überbrücken. Eventuell würde hier eine erneute PPX-Gabe zu einer weiteren Verbesserung des Überlebens führen. In zukünftigen Experimenten sollte diese Fragestellung genauso überprüft werden wie die Halbwertszeit der PPX *in vivo*. Die Erhöhung der Halbwertszeit durch Konjugation mit einer Fc-Domäne oder PEGylierung wären hier ebenfalls denkbare Möglichkeiten zur Verlängerung der Halbwertszeit (AlQahtani et al., 2019) und damit mögliche Ansätze zur Verbesserung der Therapie.

Aus der Literatur und Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ist beispielsweise auch bekannt, dass L-PolyP die Induktion von iNOS in Makrophagen hemmt und insgesamt eher in Richtung eines anti-inflammatorischen Makrophagenphänotyps polarisiert (Harada et al., 2013; Röwe, 2018). Die Aufhebung dieser Effekte würde ebenfalls die Beseitigung der initialen Infektion und ein schnelles Abklingen der Immunreaktion begünstigen. Interessant ist in diesem Zusammenhang der Befund, dass die in Blut und Peritoneallavage bestimmten Bakterientiter zwischen Therapie- und Kontrollgruppe zu dem untersuchten Zeitpunkt jedoch nicht signifikant unterschiedlich sind. Es gibt jedoch einen Trend zu höheren Bakterientitern in der PPX-behandelten Gruppe.

5.2. MYADM

5.2.1. Generierung und Phänotypisierung von MYADM^{-/-} Mäusen

Bei MYADM handelt es sich um ein Membranprotein der MAL-Familie, das unter anderem mit der myeloiden Differenzierung in Verbindung gebracht wurde (Pettersson et al., 2000). Das Protein wurde von unserer Gruppe durch Bindung an L-PolyP-beschichtete Partikel und anschließende massenspektrometrische Untersuchung als L-PolyP-bindendes Protein in BMDM identifiziert (Röwe, 2018). Im Gegensatz zu unbeschichteten Kontrollpartikeln wurde MYADM durch L-PolyP etwa doppelt so stark angereichert (Abb. 12 A). Durch Auswertung von in unserer Gruppe bereits durchgeführten, RNA-Seq basierten, Transkriptomsanalysen wurde MYADM zudem als stark durch LPS induziertes Gen identifiziert (Abb. 12 B). Die LPS-induzierte Heraufregulation wurde durch L-PolyP noch signifikant verstärkt, während L-PolyP selbst keine Induktion von MYADM zur Folge hatte. Um die immunologische Funktion von MYADM in der Folge vertieft zu untersuchen, wurden MYADM-Knock-out Mäuse mittels CRISPR/Cas9-vermittelter Genom-Editierung erstellt. Dafür wurde ein crRNA-Paar, das eine teilweise Deletion von Exon3 des Gens induzieren sollte, in Blastocysten injiziert und die behandelten Zellen in scheinchwangere Weibchen transplantiert. Die Effektivität der designten crRNAs wurde zuvor *ex vivo* PCR-basiert in Blastocysten überprüft. Hierbei konnten bereits erfolgreiche Mutageneseprozesse in Exon 3 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), sodass das Projekt *in vivo* weitergeführt wurde. Die Gründergeneration der MYADM-Knock-out Mäuse wurde mittels PCR auf erfolgreiche Editierung von Exon 3 untersucht. Dabei konnte eine Deletion von etwa 100 bp anhand der Bandengröße detektiert werden (Abb. 13 B). Durch Sequenzierung konnte die Deletion auf DNA-Ebene bestätigt und auf eine exakte Größe von 103 bp festgelegt werden (Abb. 13 C). Ausgehend von der DNA-Sequenz konnte eine mutierte Aminosäuresequenz mit vorzeitigem Kettenabbruch für die Mutante bestimmt werden. Für das auf 42 Aminosäuren trunkierte Protein mit bereits nach Aminosäure 12 abweichender Peptidsequenz (Abb. 13 D) ist aufgrund der Kürze und veränderten Sequenz keine physiologische Funktion mehr zu

erwarten, sodass von einem funktionellen Knock-out des MYADM-Gens auszugehen ist. Die Untersuchung von Knock-out-Zellen auf das trunkierte Protein beziehungsweise die Abwesenheit nativen MYADM-Proteins mittels Western Blot schlug fehl. Dies war der Tatsache geschuldet, dass aufgrund der geringen Anzahl verfügbarer Antikörper, ein kommerzieller Antikörper gegen humanes MYADM erworben und getestet wurde. Trotz großer Sequenzhomologie zwischen humanem und murinem Protein wurden mit diesem Antikörper jedoch, vermutlich aufgrund von Kreuzreaktionen mit den murinen Zelllysaten, eine Vielzahl unspezifischer Bindungen erhalten (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Lösung für dieses Problem wäre der Rückgriff auf andere Antikörper, die direkt gegen murines MYADM gerichtet sind. Auch denkbar ist, dass MYADM in den Zelllysaten unterrepräsentiert oder teilweise degradiert war, entweder aufgrund der unvollständigen Lyse und Solubilisation des Membranproteins oder aufgrund zu geringer Expression (Zhou et al., 2011; Bügi et al., 2016). Über die Expressionsstärke von MYADM in BMDM, insbesondere im Rahmen von und nach Abschluss des Differenzierungsprozesses, sind keine Daten verfügbar. Ein weiteres mögliches Problem von Membranproteinen, insbesondere unter denaturierenden Bedingungen, ist die Aggregation, die durch Exposition und Interaktion der hydrophoben Gruppen vermittelt wird (McLane et al., 2007).

Im Rahmen der Zucht der MYADM-Knock out-Mäuse wurden sowohl heterozygote als auch homozygote Verpaarungen angesetzt. Im Rahmen heterozygoter Verpaarung wurden etwa 58 % männliche und 42 % weibliche Nachkommen erhalten (Abb. 13 E). Unter diesen Nachkommen waren etwa 12 % Wildtyp-Tiere, 49 % heterozygot und 39 % homozygot. Aus der homozygoten Verpaarung (Abb. 13 F) wurden etwa 49 % weibliche und 51 % männliche Tiere erhalten, was einem zu erwartenden Geschlechtsverhältnis von etwa 1:1 entspricht. Aufgrund dieser Daten kann der MYADM-Knock-out-Stamm als fertil und lebensfähig eingestuft werden. Statistisch wird für die heterozygote Verpaarung eine Verteilung von 25 % Wildtyp : 50 % heterozygot : 25 % homozygot erwartet. Die durchschnittliche Wurfgröße betrug für beide Zuchten etwa sieben Tiere pro Wurf. Die hier erhaltene Abweichung von der theoretischen Genotypenverteilung im Rahmen heterozygoter Zucht ist vermutlich auf die relativ kleine Gruppengröße der heterozygoten Verpaarungen zurückzuführen. Als alternative Erklärung könnte man die PCR-basierte Genotypisierung heranziehen. Möglicherweise wurden einige Wildtyp-Tiere übersehen und fälschlich als heterozygote Tiere eingestuft. Da die Erkennung der homozygoten Tiere auf einer separaten PCR-Reaktion basiert und lediglich durch die erste PCR-Reaktion zur Erkennung heterozygoter und Wildtyp-Tiere bestätigt wird, ist eine fälschliche Zuordnung zu homozygoten Tieren hingegen auszuschließen.

Bei Betrachtung der klinisch-physiologischen Parameter der MYADM-Knock-out Mäuse ist auffällig, dass bei männlichen Tieren die Neutrophilenzahl auf etwa ein Drittel des Referenzwerts für C57BL6/J-Mäuse reduziert sind. Thrombozyten, Lymphozyten und B-Zellen hingegen sind gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöht (Abb. 14). Ein Mechanismus zur Erklärung dieses Umstands wurde bisher nicht aufgeklärt. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass MYADM mit der Reifung myeloider Zellen assoziiert ist (Dannaeus et al., 2005). Der Funktionsverlust von MYADM könnte demnach die beobachteten Einflüsse auf Neutro- und Thrombozytenzahl erklären. Eventuell erfüllt MYADM auch Funktionen in der Reifung lymphatischer Knochenmarksvorläufer. Dadurch würden sich die beobachteten Effekte auf Lymphozytengesamtzahl und B-Zellen erklären lassen. In diesem Zusammenhang wurde MYADM bereits in der IL-5-abhängigen B-Zell-Reifung der Maus als durch IL-5 induziertes Gen beschrieben (Horikawa & Takatsu, 2006). Allerdings wurde, etwas gegensätzlich zu diesem Befund, zuvor in der Literatur für Lymphozyten der Maus keine MYADM-Expression beschrieben (Dannaeus et al., 2005). Eine weitere interessante Fragestellung ergibt sich aus dem Umstand, dass die Neutrophilenzahl zwar drastisch

reduziert war, die Thrombozytenzahl hingegen signifikant erhöht gefunden wurde. Zudem ist der Einfluss nur bei männlichen Tieren deutlich sichtbar. Möglicherweise handelt es sich bei der Erhöhung der Thrombozytenzahl um einen kompensatorischen Mechanismus, der durch ein Problem in der Neutrophilenreifung entlang der myeloiden Reihe induziert wird. Ein hormoneller Einfluss durch Testosteron oder Östrogen ist aufgrund der Tatsache denkbar, dass der Effekt auf die Neutrophilenzahl geschlechtsspezifisch beobachtet wurde. Zusätzlich zu den klinischen Parametern wurde die Entwicklung der Tiere anhand ihrer Körper- und Organmassen untersucht. Die Massen männlicher und weiblicher Knock-out Tiere unterscheiden sich dabei kaum von denen der entsprechenden Wildtyp-Kontrollen. Für 16 Wochen alte, männliche C57BL6/J-Tiere wird von Seiten des Züchters ein Gewicht von $30,1 \pm 2,1$ g angegeben, für weibliche Tiere gleichen Alters ein Gewicht von $22,6 \pm 1,8$ g. Die experimentell gemessenen Werte stimmen mit diesen Daten gut überein.

Die für die klinischen Parameter erhaltenen Daten zeigen ebenfalls gute Übereinstimmung mit den in der Literatur berichteten Referenzwerten (Boehm et al., 2007; Mazzacara et al., 2008). Sowohl die Ionenkonzentrationen, als auch Serumprotein-, Serum-Stickstoffspezies und Blutglukose liegen innerhalb der in der Literatur für beide Geschlechter vorgegebenen Referenzbereiche (Tab. 22).

Tab. 22: Referenzwerte für klinisch-physiologische Parameter adulter C57BL6/J Mäuse und Vergleich mit den experimentell erhaltenen Daten. Die angegebenen Referenzwerte entstammen Boehm et al. 2007 und Mazzacara et al., 2008.

Parameter	Referenzbereich Mittelwert ± S.D.		Messwert WT Mittelwert ± S.D		Messwert MYADM ^{-/-} Mittelwert ± S.D.	
	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen
Hämatokrit (%)	12,5 – 53,0 37,6 ± 3,6	16,2 – 58,3	10,89 ± 5,6	16,13 ± 1,8	13,0 ± 2,3	18,8 ± 2,5
Leukozyten (10 ³ /mm ³)	2,47 – 14,42	2,20– 11,53	1,63 ± 0,44	1,39 ± 0,29	2,35 ± 0,31	2,18 ± 0,54
Thrombozyten (10 ³ /mm ³)	155,55– 1036,88 627 ± 146	144,00– 894,00	321,00±66,55	336,50±52,63	402,00±36,30	418,83±45,17
MCV (fl)	43,4 – 47,8 45,3 ± 1,8		52,1 ± 1,2	52,3 ± 1,2	51,5 ± 1,0	51,3 ± 1,7
Lymphozyten (%)	76 – 91 86,7 ± 1,6		67,9 ± 13,4	98,4 ± 2,4	91,1 ± 1,1	90,5 ± 3,5
Monozyten (%)	0 – 4 0,9 ± 0,3		6,7 ± 2,4	1,8 ± 1,2	1,2 ± 0,5	1,2 ± 0,5
Neutrophile (%)	8 – 20 12,0 ± 1,1		11,9 ± 3,2	6,0 ± 1,8	3,8 ± 1,2	4,9 ± 1,4
Eosinophile	0 – 3 0,6 ± 0,2		1,9 ± 0,6	2,4 ± 0,3	2,0 ± 0,6	3,1 ± 2,3
Basophile	0 0		0,1 ± 0,1	1,1 ± 2,7	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Elektrolyte	Referenzbereich Median					
Na ⁺ (mM)	149 – 165 155	147 – 162 158	148 ± 1	142 ± 2	149 ± 1	144 ± 2
K ⁺ (mM)	5,2 – 14,5 6,6	4,0 – 14,0 6,6	5,9 ± 0,5	6,7 ± 0,7	5,9 ± 0,5	6,7 ± 1,3
Ca ²⁺ (mM)	2,2 – 2,6 2,4	2,3 – 3,5 2,5	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,3	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,1
Cl ⁻ (mM)	109,0 – 197,2 131,1	110,0 – 204,4 137,4	113,1 ± 1,3	111,2 ± 2,9	110,3 ± 1,4	112,0 ± 1,6
Protein						
Gesamtprotein (g/l)	47 – 72 63	45 – 83 66	47 ± 3	48 ± 1	50 ± 2	49 ± 1
Albumin (g/l)	22 – 42 33	20 – 47 34	12 ± 2	14 ± 1	11 ± 2	14 ± 1
Stickstoff						
Kreatinin (µM)	11 – 28 17	11 – 28 15	30,4 ± 0,9	33,8 ± 2,0	28,4 ± 1,6	29,7 ± 3,5
Harnstoff (mM)	3,2 – 13,2 9,0	6,0 – 11,5 8,7	10,8 ± 0,5	10,0 ± 0,2	9,9 ± 1,7	9,8 ± 1,3
Harnsäure (µM)	36 – 119 89	18 – 232 107	19,0 ± 3,7	33,6 ± 10,8	16,8 ± 0,0	24,2 ± 6,1
Zucker						
Glukose (mM)	2,9 – 15,9 8,3	5,9 – 16,7 9,9	11,4 ± 1,2	12,8 ± 2,3	10,4 ± 1,8	10,1 ± 1,4

Bei den Blutzellparametern ist der Hämatokritwert im Vergleich mit der Literatur für beide Geschlechter gegenüber dem in der Literatur angegebenen Bereich von 12,5 – 58,3 % verringert und MCV (51,3 – 52,3 fl) gegenüber dem Referenzwert (45,3 ± 1,8 fl) leicht erhöht. Die sonstigen relativen Anteile der Blutzellen sind mit den in der Literatur berichteten Referenzwerten hingegen kongruent (Santos et al., 2016). Unterschiede im Hämatokrit und MCV könnten beispielsweise auf die Messmethode oder die Probenvorbereitung zurückzuführen sein. Die Messung von murinen Blutparametern war auf den verwendeten Geräten des Zentrallabors der Universitätsmedizin Mainz, das primär Humanproben misst,

nicht validiert, sodass methodisch begründete Messabweichungen nicht auszuschließen sind. Auch die Probenvorbereitung kann in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen.

5.2.2. Rolle von MYADM bei der zellulären Signalgebung im Entzündungsgeschehen

IL1R2 und TGF β 2 sind bekannte molekulare Interaktoren von humanem MYADM (Abb. 12; Breitzkreutz et al., 2003). Der Einfluss von MYADM-Verlust auf die Expression von IL1R2 und TGF β 2 wurde deshalb mittels quantitativer PCR in murinen BMDM untersucht. Für beide Zielgene wurde mittels quantitativer PCR eine verminderte Expression bereits in unstimulierten Knock-out BMDM detektiert (Abb. 18). Die IL-1 Ligandenfamilie und die zugehörigen Rezeptoren wurden in der Literatur bereits ausführlich mit akuter und chronischer Entzündung in Verbindung gebracht. Anakinra, ein humanes, rekombinantes IL-1RA-Analog, ist beispielsweise für die Behandlung rheumatoider Arthritis zugelassen (Dinarello et al., 2012; Dinarello, 2011, Dinarello, 2009; Peters et al., 2013). IL1R2 fungiert als *decoy* Rezeptor und fängt somit ansonsten biologisch aktives IL-1 ohne Signalauslösung ab. Damit ist IL1R2 neben dem IL1-Rezeptorantagonisten (IL-1RA), der als kompetitiver Inhibitor des IL1-Rezeptors (IL1R1) fungiert, einer der zwei endogenen Regulatoren der IL-1 (IL-1 α und IL-1 β) Signalgebung. Im Rahmen von Sepsis oder operativem Trauma wurden signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-1RA und löslichem IL-1R2 gefunden. Dies korrelierte gleichsam mit einem verstärkten Entzündungsgeschehen (Peters et al., 2013; Mora-Buch et al., 2016). Wie andere Therapieansätze der Sepsis, die sich auf die Dämpfung der initial überschießenden Immunreaktion, fokussierten, schlugen auch klinische Studien mit Anakinra, fehl. Zwar konnte eine leichte Reduktion der Mortalität unter Anakinra-Therapie beobachtet werden, die erhaltenen Reduktionen waren jedoch insgesamt nicht statistisch signifikant (Opal et al., 1997; Eichacker et al., 2002). Reduziertes IL-1R2 in MYADM^{-/-} Tieren könnte folglich mit einer veränderten Überlebensrate im Rahmen akuter und chronischer experimenteller Entzündungsgeschehen assoziiert sein.

Die immunologischen Funktionen von TGF- β im Rahmen der Sepsis wurden in der Literatur bereits kontrovers diskutiert. Während reduzierte TGF- β -Expression in Wunden septischer Tiere beschrieben wurde und dort sowohl für das *Homing* von Immunzellen und die Wundheilung verantwortlich ist (Leask & Abraham, 2004; Wang et al., 2006), wurde TGF- β auch als wichtiger endogener Entzündungshemmer beschrieben (Qian et al., 2008). Es ist jedoch ebenfalls bekannt, dass TGF- β die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine wie IL-6 und TNF- α fördern kann. Erhöhte TGF- β Konzentrationen konnten in diesem Zusammenhang im Blut septischer Mäuse nachgewiesen werden (Chaudhry et al., 2013; Ayala et al., 1993). Transgene Mäuse, die TGF- β 1 nach LPS-Induktion überexprimieren zeigten im Tierversuch erhöhte Mortalität, die auf endotoxämischen Schock – bedingt durch massive Sekretion von TNF- α und IL-6 - zurückgeführt werden konnte. (Garcia-Lazaro et al., 2005) Während TGF- β -Signalgebung in Immunzellen die inflammatorische Effektorfunktion möglicherweise suprimieren kann, scheint ebendiese Signalgebung in der Leber zu vermehrter LPS-stimulierter Sekretion inflammatorischer Cytokine zu führen. Dies prädisponiert für einen lethalen endotoxämischen Schock (Garcia-Lazaro et al., 2005). Bei Vergleich von 28 Patientenproben nach gram-positiver Sepsis mit 11 Patienten mit gram-negativer Sepsis und 15 Gesunden konnte hingegen keine Rolle von TGF- β in der Entwicklung gram-positiver Sepsis oder bezüglich der zu erwartenden Prognose, gefunden werden (Knapp et al., 1998). Im Gegensatz zu den Tierstudien scheinen diese Befunde darauf hinzuweisen, dass TGF- β in der humanen Sepsis nur eine untergeordnete Rolle spielen könnte (Chaudhry et al., 2013; Knapp et al., 1998). TGF- β wurde abseits der Sepsispathogenese unter anderem mit *Forkhead-Box-Protein P3* (Foxp3)-Genexpression und Entwicklung regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) sowie einer Inhibition der Lymphozyten- und Phagozytenaktivierung in Verbindung gebracht (Saini et al., 2014; den Hartog et al., 2013;

Nianshuang et al., 2015). Darüber hinaus ist TGF- β bekannter Induktor der Epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), die auch für Tumordinvasion, -angiogenese und Metastase verantwortlich ist (Ferrari et al., 2009; Gao et al., 2014). Eine Modulation der Rezeptorexpression im MYADM-KO-Tieren könnte somit auch zu einer Veränderung in der Tumorneigung der Mäuse oder zu einer veränderten Anfälligkeit gegenüber Autoimmunerkrankungen führen, insbesondere, da TGF- β ein kritisches Cytokin für die Induktion von Th9 und Th17-Zellen, sowie ein Regulator der Foxp3-positiven, regulatorischen T-Zellen ist. Zudem supprimiert es die Th1 und Th2 Effektordifferenzierung CD4-positiver T-Zellen (Oh & Li, 2013; Tu et al., 2014; Hiraki et al., 2012; Vieira da Silva Pellegrina et al., 2015)

5.3. TMEM206

5.3.1. Generierung und Phänotypisierung von TMEM206^{-/-} Mäusen

Das Transmembranprotein TMEM206 konnte durch Bindungsstudien mit L-PolyP-beschichteten Mikropartikeln und anschließende massenspektrometrische Analyse der gebundenen Proteinfraction als L-PolyP bindendes Protein identifiziert werden. Durch Analyse vorhandener Transkriptomdaten aus BMDM konnte zudem eine starke Herunterregulation durch LPS festgestellt werden, die durch L-PolyP partiell aufgehoben wurde (Abb. 19). L-PolyP allein zeigte eine geringe, aber bereits signifikante Induktion der TMEM206 Transkription (Abb. 19 B). Um eine Funktion von TMEM206 als vermeintlicher L-PolyP-Rezeptor in Makrophagen aufzuklären und mehr über die immunologische Funktion von TMEM206 zu erfahren, wurden auch hier mittels CRISPR/Cas9-System murine Knock-outs erstellt. Dies erfolgte durch *targeting* von Exon 2 des TMEM206 Gens mittels zweier gRNAs, die im Falle der geplanten Editierung zu einer vollständigen Deletion des Exons und damit zu einem trunkierten, nicht funktionalen, Protein führen sollten (Abb. 20 A). Der Erfolg der Editierung konnte zunächst mittels PCR (Abb. 20 B) und anschließend auch durch Sequenzierung und Transkriptanalyse nachgewiesen werden (Abb. 20 C, D). Die Sequenzierung zeigte eine Deletion von 120 bp innerhalb von Exon 2. Dies entspricht praktisch dem Verlust des gesamten Exons. Auf RNA-Ebene zeigt sich im Knock-out eine gegenüber dem Wildtyp stark verminderte Konzentration von TMEM206 Transkripten. Dies ist ein Indiz für *nonsense-mediated decay* (NMD) der entsprechenden Transkripte mit vorzeitigem Stop-Codon im Rahmen einer Leserastermutation. NMD ist hierbei als ein Qualitätskontrollprozess der zellulären Transkripte zu verstehen, der die Translation mutierter mRNAs verhindern sollt (Nickless et al., 2017).

Auch für die TMEM206-Knock-out Tiere wurde eine vollständige Zuchtanalyse hetero- und homozygoter Verpaarungen durchgeführt. Innerhalb der heterozygoten Zucht (Abb. 20 E) konnte eine Geschlechtsverteilung von etwa 46 % männlichen und 54 % weiblichen Tieren erhalten werden. Davon waren etwa 18 % Wildtyp-Tiere, 65 % heterozygot und 17 % homozygot. Gegenüber der theoretischen zu erwartenden Verteilung von 25 % Wildtyp, 50 % heterozygot und 25 % homozygot ist der Anteil heterozygoter Tiere erhöht und der Anteil an Wildtyp und homozygoten KO-Tieren verringert. Abweichungen können aus der relativ kleinen Gruppengröße von etwa 120 Tieren und aus der Genotypisierung resultieren. Es ist möglich, dass einige Wildtyp-Tiere aufgrund schwacher Bandenintensität fälschlich der heterozygoten Gruppe zugeordnet wurden. Auch denkbar ist, dass einige homozygote Tiere, die eine schwache Wildtyp-Bande zeigten, sei es aufgrund von Kontamination der Ohrbiopsien oder aufgrund einer Kontamination beim Transfer der Proben auf das Agarosegel, als heterozygot zugeordnet wurden. Wie bei der Genotypisierung der MYADM-Knock-out Tiere basiert die Feststellung des Knock-outs (homozygot) auf zwei PCR-Reaktionen, die kongruente Resultate liefern müssen. Eine fälschliche Zuordnung von

heterozygoten oder gar Wildtyp-Tieren zur Gruppe der homozygoten Tiere ist damit weitgehend auszuschließen. Im Rahmen der homozygoten Verpaarung (Abb. 20 F) wurden insgesamt 67 Tiere erhalten bei einem Geschlechtsverhältnis von 51 % männlichen und 49 % weiblichen Tieren erhalten. Dies entspricht der theoretisch erwarteten Geschlechterverteilung von 1:1. Durch die Zuchtergebnisse, insbesondere den Anteil homozygoter Tiere (17 %) innerhalb der heterozygoten Zucht, lassen sich die Tiere des TMEM206 Knock-out-Stamms als lebensfähig und fertil einstufen. Im Rahmen der heterozygoten Verpaarung wurden dabei durchschnittlich etwa sieben und bei der homozygoten Verpaarung sechs Nachkommen pro Wurf erhalten.

Wie beim MYADM Knock-out Stamm wurden auch die Tiere des TMEM206 Knock-out Stamms bezüglich Ihrer Blutzellpopulationen und der klinisch-physiologischen Parameter untersucht (Abb. 21). Hierbei zeigten sich eine verringerte Zahl von Neutrophile und eine erhöhte Zahl Lymphozyten im Blut männlicher Knock-out Tiere. Darüber hinaus ist die Blutglukosekonzentration beider Geschlechter gegenüber den entsprechenden Wildtypkontrollen signifikant verringert. Die B-Zellkonzentration in der Milz männlicher Tiere ist für Knock-out Tiere signifikant erhöht, die Monozytenzahl hingegen signifikant verringert (Abb. 21 H und I).

Tab. 23: Gegenüberstellung erhaltener klinisch-chemischer Parameter für TMEM206-Knock-out Mäuse für Männchen und Weibchen und Angabe der Referenzwerte. Die angegebenen Referenzwerte entstammen Boehm et al., 2007 und Mazzacara et al., 2008.

Parameter	Referenzbereich		Messwert WT		Messwert TMEM206 ^{-/-}	
	Mittelwert ± S.D.		Mittelwert ± S.D.		Mittelwert ± S.D.	
	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen
Hämatokrit (%)	12,5 – 53,0 37,6 ± 3,6	16,2 – 58,3	15,6 ± 1,9	13,2 ± 2,0	15,0 ± 2,0	14,3 ± 1,1
Leukozyten (10 ³ /mm ³)	2,47 – 14,42	2,20 – 11,53	1,63 ± 0,44	1,95 ± 1,12	1,61 ± 0,42	1,47 ± 0,64
Thrombozyten (10 ³ /mm ³)	155,55 – 1036,88 627 ± 146	144,00 – 894,00	321,00 ± 66,55	315,25 ± 57,04	378,40 ± 45,52	335,13 ± 39,91
MCV (fl)	43,4 – 47,8 45,3 ± 1,8		52,1 ± 1,2	52,6 ± 4,9	53,1 ± 1,3	51,6 ± 1,2
Lymphozyten (%)	76 – 91 86,7 ± 1,6		79,4 ± 11,1	90,2 ± 2,6	88,5 ± 2,4	90,1 ± 2,2
Monozyten (%)	0 – 4 0,9 ± 0,3		4,8 ± 2,9	1,0 ± 0,4	2,8 ± 1,8	1,9 ± 2,0
Neutrophile (%)	8 – 20 12,0 ± 1,1		9,8 ± 4,0	5,9 ± 2,3	5,5 ± 1,5	4,6 ± 1,8
Eosinophile	0 – 3 0,6 ± 0,2		2,2 ± 0,7	2,6 ± 1,0	2,7 ± 1,1	3,1 ± 0,6
Basophile	0 0		0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Elektrolyte	Referenzbereich Median					
Na ⁺ (mM)	149 – 165 155	147 – 162 158	148 ± 1	148 ± 2	148 ± 2	146 ± 2
K ⁺ (mM)	5,2 – 14,5 6,6	4,0 – 14,0 6,6	5,9 ± 0,5	5,1 ± 0,4	6,9 ± 0,4	6,4 ± 1,1
Ca ²⁺ (mM)	2,2 – 2,6 2,4	2,3 – 3,5 2,5	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,1
Cl ⁻ (mM)	109,0 – 197,2 131,1	110,0 – 204,4 137,4	113,1 ± 1,3	113,4 ± 2,1	111,7 ± 0,5	115,6 ± 1,1
Protein						
Gesamtprotein (g/l)	47 – 72 63	45 – 83 66	47 ± 3	50 ± 2	50 ± 4	50 ± 1
Albumin (g/l)	22 – 42 33	20 – 47 34	12 ± 1	14 ± 1	11 ± 1	14 ± 1
Stickstoff						
Kreatinin (µM)	11 – 28 17	11 – 28 15	30,4 ± 0,9	34,1 ± 2,1	30,5 ± 1,9	29,3 ± 2,2
Harnstoff (mM)	3,2 – 13,2 9,0	6,0 – 11,5 8,7	10,8 ± 0,5	9,7 ± 1,2	11,3 ± 1,2	9,7 ± 0,6
Harnsäure (µM)	36 – 119 89	18 – 232 107	19,0 ± 3,7	19,5 ± 5,6	21,1 ± 2,1	19,6 ± 4,5
Zucker						
Glukose (mM)	2,9 – 15,9 8,3	5,9 – 16,7 9,9	11,4 ± 1,2	10,5 ± 0,6	9,6 ± 0,6	8,8 ± 1,8

Als Grundlage für weitere Untersuchungen wurde die Expression von TMEM206 in Immunzellen mittels PrimeFlow-Assay jeweils auf Transkriptebene untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass TMEM206 vor allem in Immunzellen exprimiert wird, die als Antigen-präsentierende Zellen bekannt sind (Abb. 23). Namentlich sind dies Makrophagen, B-Zellen und Dendritische Zellen. Darüber hinaus wurde die TMEM206-Expression auch in den als Modellsystem verwendeten BMDM überprüft (Abb. 22). Hierbei wurde festgestellt, dass TMEM206 auch in BMDM deutlich exprimiert wird. Die starke Expression in Antigen-präsentierenden Zellen wirft die Frage auf, welche Funktion TMEM206 in diesen Zellen

wahrnimmt und welchen immunologischen Phänotyp ein TMEM206-Funktionsverlust zur Folge hat. In der Literatur wurde kürzlich berichtet, dass TMEM206 ein Bestandteil des Protonen-aktivierten ASOR-Ionenkanals ist, der unter aziden Bedingungen öffnet und Chlorid-Ioneninflux erlaubt (Ullrich et al., 2019). Dies führt zu einer osmotischen Schwellung der Zellen und in der Folge zum Zelltod. Dieser Mechanismus erklärt, warum TMEM206^{-/-} Neuronen gegen säurevermittelten Zelltod geschützt sind (Yang et al., 2019; Ullrich et al., 2019). In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Befund mit BMDM bestätigt werden (Abb. 25). Die unter aziden Bedingungen durchflusszytometrisch bei pH5,5 vorgefundene Lebendzellpopulation nach 24-stündiger Inkubation ist für TMEM206^{-/-} BMDM gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöht (Abb. 25). Bei neutralem pH-Wert werden hingegen keine signifikanten Unterschiede in den Lebendzellpopulationen zwischen TMEM206^{-/-} und Wildtyp erhalten. Idealerweise sollte hier noch eine alternative FACS-unabhängige Methode zur Bestimmung des Zelltods zurückgegriffen werden. In der Literatur wird eine Vielzahl möglicher Alternativen, wie beispielsweise der MTT- oder Neutralrot-Test, beschrieben (Fotakis & Timbrell, 2006).

5.3.2. Bedeutung von TMEM206 für die Makrophagenfunktion

Zur Evaluation der immunologischen Funktion von TMEM206 in BMDM wurde die Induktion von iNOS, die mit NO einen der Hauptmetaboliten der antimikrobiellen Makrophagenfunktion synthetisiert, untersucht. Zunächst wurde dafür die iNOS-Proteinmenge mittels intrazellulärer FACS-Färbung nach Induktion der iNOS-Expression durch LPS untersucht (Abb. 27). Hierbei konnte eine etwas geringere iNOS-Fluoreszenz für den TMEM206-Knock-out festgestellt werden, die auf eine geringere Menge iNOS in Knock-out BMDM hinweist (Abb. 27 A). Die festgestellten Effekte sind jedoch zu gering, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu erhalten. Der zugrundeliegende Trend konnte jedoch mehrfach bestätigt werden. Um zu untersuchen, ob diese geringere iNOS-Menge auch mit einer tatsächlich verringerten NO-Produktion korreliert, wurde mittels Griess-Test die Konzentration des nach LPS-Stimulation freigesetzten NO im Zellkulturüberstand bestimmt (Abb. 27 B). Dies erfolgte durch den Griess-Test indirekt über Messung des stabilen Oxidationsprodukts Nitrat. Für die mit LPS stimulierten TMEM206^{-/-} BMDM wurden dabei nach 24 h Stimulation signifikant geringere Nitrat-Konzentrationen gefunden als für die Wildtyp-Kontrollen. Dieser Befund bestärkt noch einmal den per Durchflusszytometrie beobachteten Trend niedrigerer iNOS-Expression beziehungsweise verminderter Induktion in den TMEM206^{-/-} BMDM.

Zusätzlich zur iNOS-Aktivität wurde die Phagozytose-Aktivität der TMEM206^{-/-} BMDM mittels pHrodo-Phagozytose-Test fluorimetrisch untersucht (Abb. 28). Dabei konnte ein signifikant geringeres Fluoreszenzsignal in TMEM206^{-/-} BMDM nachgewiesen werden. Da pHrodo unter neutralen, extrazellulären Bedingungen lediglich vernachlässigbar geringe Fluoreszenz zeigt (Miksa et al., 2009) und erst nach Phagozytose und Ansäuerung im endosomalen Weg die Fluoreszenz signifikant zunimmt, sind zwei Erklärungen für diese gemachte Beobachtung denkbar. Einerseits die tatsächlich veränderte Phagozytose mit verringerter pHrodo-Aufnahme und andererseits eine verminderte lysosomale Ansäuerung mit dadurch bedingter geringerer Fluoreszenzemission in den TMEM206^{-/-} BMDM. Diese möglichen Probleme des pHrodo Assay in der Diskriminierung der betroffenen Endozytosemechanismen könnten beispielsweise durch Verwendung ratiometrischer Methoden unter Verwendung eines pH-empfindlichen und pH-unempfindlichen Fluorophors, umgangen werden (Johnson et al., 2016). Um zu bestimmen, ob tatsächlich ein Ansäuerungsdefekt in den Lysosomen der Knock-out BMDM vorliegt, könnte auch der lysosomale pH-Wert durch Verwendung entsprechender Fluoreszenzreporter anhand einer erstellten Eichgerade konkret gemessen werden. In der Literatur sind mehrere mögliche

Methoden hierfür beschrieben (Shi et al., 2019; Johnson et al., 2016; Xue et al., 2017, Ma et al., 2017). Die Auflösungsgrenze dieser Tests wird dabei maßgeblich durch die eintretende Azidifizierung der Lysosomen bestimmt. Eine Vielzahl Reagenzien, wie beispielsweise das klassischerweise verwendete FITC-Dextran-System scheitern jedoch aufgrund ihrer intrinsischen Eigenschaften ($pK_a = 6,4$) an der exakten Darstellung der tatsächlich vorliegenden, oftmals sehr niedrigen pH-Werte (pH4.5 – pH5.5) (Luo et al., 2017; B. Hoffmann and H. Kosegarten, 1995; Marchetti et al., 2009). pHrodo Green besitzt einen pK_a -Wert von 6,8 (Langsdorf et al., 2013). Für die exakte Detektion extrem niedriger lysosomaler pH-Werte sind demnach sowohl FITC-Dextran als auch pHrodo Green als ungeeignet zu bewerten. Vielmehr können Sie als qualitative Methoden zur ersten Evaluierung einer betroffenen Phagozytose dienen. Während die Fluoreszenz des FITC-Dextran-Konjugats unter aziden Bedingungen drastisch abnimmt, zeigt pHrodo jedoch erst bei Ansäuerung im endosomalen Weg eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzemission. Der Vorteil dieser Methode ist, dass etwaige geringe Fluoreszenzwerte, die beim FITC-Dextran nach Protonierung erhalten werden (Chaudhari et al., 2017) und aufgrund fehlender Sensitivität im Hintergrund des Messsystems verloren gehen könnten, dadurch umgangen werden. In der Literatur wurden bereits Fluorophore beschrieben, die einen deutlich niedrigeren pK_a aufweisen als FITC-Dextran und pHrodo und damit für exakte lysosomale pH-Bestimmungen geeigneter wären. Ein Beispiel hierfür wäre Oregon Green mit einem pK_a von 4,7 (Vergne et al., 1998). Die Verwendung ratiometrischer Methoden, beispielsweise die Kombination von Oregon Green mit dem pH-insensitiven AlexaFluor 647 (Johnson et al., 2016), kann die dynamische Bandbreite der Test erhöhen und bietet eine intrinsische Möglichkeit zur Korrektur der Messwerte gegenüber Umwelteffekten (Schwankungen der Anregungsstärke, intrazelluläre Verteilung) und beispielsweise intrazellulärer Dynamik und Konzentration (Guha et al., 2014; Luo et al., 2017, Wang et al., 2015).

Zur Diskriminierung zwischen einer tatsächlich veränderten Phagozytose oder einer unspezifischen Bindung im pHrodo-System könnte die Anzahl aufgenommener Partikel sowie die daraus resultierende Fluoreszenzintensität beispielsweise konfokalmikroskopisch bestimmt werden. Hierbei könnten die Zellen auch bezüglich unspezifischer Oberflächenbindung der verwendeten Agenzien untersucht werden. Eine Kombination von mikroskopischer Evaluation und gleichzeitiger durchflusszytometrischer Analyse wäre durch die Verwendung, moderner gekoppelter Detektionsgeräte (bildgebende Durchflusszytometrie, beispielsweise ImageStream der Firma Luminex) möglich.

Neben den gefundenen Einflüssen des TMEM206-Funktionsverlusts auf die Phagozytose und iNOS-Induktion/NO-Produktion von Makrophagen, wurde auch der Effekt auf die Cytokinsekretion untersucht. Dabei wurde die durch Stimulation mit TLR-Agonisten von gram-positiven und gram-negativen Bakterien (LPS, LTA) sowie Interferonen (Interferon- β , Interferon- γ) ausgelöste IL-27 Sekretion quantifiziert. Hierbei konnte eine erhöhte IL-27 Freisetzung durch TMEM206^{-/-} BMDM gegenüber Wildtyp-Zellen festgestellt werden (Abb. 29). LPS und LTA sind starke Induktoren von IL-27. Die Induktion wird jeweils durch L-PolyP gehemmt, für den Knock-out ist dieser Effekt signifikant. Beide Interferone induzieren IL-27, wobei Stimulation mit IFN- γ zu etwa doppelt so hohen IL-27 Konzentrationen führt wie IFN- β (Abb. 29).

5.4. TMCO1

Auch das Transmembranprotein TMCO1 wurde durch Bindungsexperimente an L-PolyP gekoppelten Partikeln massenspektrometrisch identifiziert. TMCO1 aus BMDM-Lysaten wurde durch L-PolyP im Vergleich mit der Kontrolle ungekoppelter Partikel etwa zweifach so stark angereichert (Abb. 32 A). Zusätzlich wurde TMCO1 durch Auswertung bestehender RNA-Seq-Daten als stark LPS-reguliertes Gen identifiziert (Abb. 32 B). Unter LPS-Stimulation wurde die TMCO1 Expression signifikant auf etwa die Hälfte des unter naiven Bedingungen erhaltenen Wertes herunterreguliert. Co-Stimulation mit L-PolyP verringerte die Stärke der Inhibition, sodass hier gegenüber der LPS-stimulierten Bedingung leicht, aber dennoch signifikant erhöhte Expression gefunden wurde. L-PolyP allein hingegen zeigte keinen Einfluss auf die Stärke der TMCO1 Expression. Die Zuchtstatistik der heterozygoten Verpaarung zeigte, dass es sich um einen subviablen und subfertilen Stamm handelt. Die Anteile homozygoter Knock-out Tiere betragen für die Gesamtzahl der Männchen und Weibchen lediglich 6 % beziehungsweise 4 %. Der Anteil heterozygoter Männchen betrug etwa 72 %, der der Weibchen 64% bei etwa 24 % männlichen und 32 % weiblichen Wildtyp-Tieren (Abb. 33).

Um den Einfluss eines TMCO1-Verlusts auf die Entzündungsantwort *in vivo* zu evaluieren, wurden, aufgrund der geringen Zahl homozygoter Tiere, Knochenmarkchimären generiert. Aufgrund der im Vergleich zur CLP zu erwartenden geringeren Varianz, wurde hierbei auf das experimentelle Modell der Endotoxämie zurückgegriffen. Durch intraperitoneale Applikation von LPS wurde eine Immunantwort über Aktivierung von TLR induziert. Der Schweregrad der Reaktion wurde anhand der klinischen Schweregradkriterien (CSS, *clinical severity score*) nach Gonnert et al. (2011) evaluiert (Abb. 34). Hierbei wurde nach zehnstündiger Inkubationszeit ein kleiner, aber signifikanter Unterschied zwischen TMCO1^{-/-} und Kontrollgruppe beobachtet. Analyse der Plasmacytokine zu diesem Zeitpunkt offenbarte signifikant erhöhte Konzentrationen von MIP1 α , MIP1 β , RANTES und IL-10. Generell erschienen auch die meisten anderen untersuchten Cytokine tendenziell leicht erhöht, hier sind die beobachteten Effekte jedoch nicht stark genug, um einen signifikanten Unterschied herbeizuführen. Zusätzlich zur Untersuchung der Plasmacytokine wurde auch der Influx inflammatorischer Zellen in das Peritoneum der Tiere analysiert. Dafür wurde das Peritoneum zum Ende des Beobachtungszeitraumes lavagiert und die eingewanderten Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten durchflusszytometrisch quantifiziert (Abb. 36). Tendenziell zeigte sich im TMCO1-Knock-out eine tendenziell verringerte Anzahl von Makrophagen, während die Neutrophilenzahl leicht erhöht erschien. Die beobachteten Effekte waren jedoch insgesamt nicht signifikant. Die Schwankungsbreite der erhaltenen Zellzahlen ist relativ groß, bei einer vergleichsweise kleinen Gruppengröße (n = 6 für den Knock-out, n = 7 für die Kontrollgruppe), sodass der Versuch durch eine deutliche Erhöhung der Tierzahl in seiner Aussagekraft sicherlich hätte verbessert werden können. Aufgrund des Zuchtdefekts der Tiere, der auch in der Literatur bereits beschrieben wurde (Sun et al., 2018), konnte jedoch keine höhere Zahl Knock-out Tiere generiert beziehungsweise letztendlich für den Knochenmarkstransfer eingesetzt werden. Für die Zukunft ist die Verwendung eines konditionalen TMCO1-Knock-out Stammes anzuraten, um die beobachteten Fertilitäts- und Viabilitätsprobleme zu umgehen.

6. Ausblick

6.1. Rolle von L-PolyP im Rahmen systemischer, bakterieller Infektion

L-PolyP ist ein polyanionischer bakterieller Metabolit, der Primär als zellulärer Energiespeicher und Phosphatgruppenreservoir dient. Zusätzlich wurde eine Funktion als Pathogenitätsfaktor humanpathogener Mikroorganismen bereits in der Literatur beschrieben (Kim et al., 2002). Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Einfluss von L-PolyP auf die Induktion der angeborenen Immunantwort sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass L-PolyP die insbesondere über TLR2 und TLR4 induzierte angeborene Immunantwort in Makrophagen moduliert. Die LPS-induzierte Freisetzung von IL-27 und CXCL-10 durch Makrophagen wurde durch L-PolyP inhibiert. Die PF4-Antwort hingegen maßgeblich verstärkt. Darüber hinaus inhibierte L-PolyP die antimikrobielle Antwort von BMDM durch Verminderung von Antigenpräsentation, *i*NOS-Induktion und *Irg1*-Expression. Im murinen Sepsismodell führte enzymatischer Verdau bakteriell freigesetzten L-PolyP durch rekombinant hergestellte PPX zu einem signifikant verbesserten Überleben behandelte Tiere gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Ein zugrundeliegender Mechanismus für den Erfolg dieser Behandlung konnte bisher nicht zweifelsfrei aufgedeckt werden. Untersucht wurden hierfür absolute Zellzahlen der ins Peritoneum eingewanderten Neutrophilen und Makrophagen sowie die Anzahl KBUs. Nach PPX-Behandlung wurden lediglich erhöhte Neutrophilenzahlen im Peritoneum beobachtet. Signifikante Unterschiede in Blut- und Lavage-KBUs sowie Makrophagenzahl konnten nicht gefunden werden. Zum Beweis, dass tatsächlich die Phosphataseaktivität der injizierten PPX für die beobachtete Verbesserung verantwortlich ist, könnte einer Kontrollgruppe eine, beispielsweise durch Mutation der Aminosäuren des aktiven Zentrums oder Inhibitorbindung, inaktivierte PPX verabreicht werden. Zeigen diese Tiere keine weitere Überlebensverbesserung, ist der Therapieerfolg mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Phosphataseaktivität und nicht nur beispielsweise auf die Bindung des PolyP an die PolyP-bindende Domäne der PPX zurückzuführen. Zur weiteren Verbesserung des Therapieansatzes sollte die Pharmakokinetik, insbesondere die Halbwertszeit, der PPX *in vivo* näher untersucht werden. Durch Verwendung radioaktiv oder fluoreszenzmarkierter PPX könnte beispielsweise die in die Blutbahn übergegangene Fraktion bestimmt und die Verteilung in weitere Gewebe fluoreszenzmikroskopisch oder radioskopisch untersucht werden. Die Halbwertszeit des Proteins *in vivo* könnte durch Modifikation mit Polyethylenglykol (sogenannte PEGylierung) oder durch Fusion mit einer Fc-Domäne erhöht werden (AlQahtani et al., 2019). Möglicherweise könnte hiermit das Versterben behandelte Tiere noch weiter herausgezögert oder gänzlich vermieden werden. Anstelle der Erhöhung der Halbwertszeit könnte auch eine zweite Gabe des Proteins, beispielsweise nach etwa drei Tagen, also dem Zeitpunkt, zu dem die ersten behandelte Tiere anfangen zu versterben, erfolgsversprechend sein.

Zur Aufklärung des Mechanismus sollten die aus dem Peritoneum behandelte und unbehandelte Tiere isolierten Zellen genauer bezüglich ihrer Phagozytoseaktivität, *i*NOS-Induktion und Phagozytoseaktivität untersucht werden. Hierzu bieten sich durchflusszytometrische Untersuchungen an. Die im Peritoneum freigesetzte Menge NO könnte auch durch fotometrische Messung des stabilen Oxidationsprodukts Nitrat in der Lavageflüssigkeit näherungsweise bestimmt werden. Aufgrund der teilweise großen Schwankungsbreite der erhaltenen KBU-Werte sollten diese Messungen noch einmal mit erhöhter Tierzahl und breiterem Verdünnungsraster durchgeführt werden. Bisher wurden für jede Blut- (Verdünnung 1:10 und 1:100) beziehungsweise Lavage-Probe (Verdünnung 1:1000 und 1:10000) nur zwei Verdünnungen zur KBU-Bestimmung ausgetrichen, die Verwendung einer dritten Verdünnung wäre für zukünftige Experimente anzuraten. Da

insbesondere die Zahl der Blut-KBU sich als sehr variabel präsentierte und oftmals sehr gering ausfiel, sollte hier auch unverdünnt ausgestrichen werden. Für die Lavageproben sollte zusätzlich noch mindestens eine 1:100 Verdünnung genutzt werden, da auch hier experimentell enorme Schwankungsbreiten in der Zahl der bestimmten KBU erhalten wurden.

6.2. Rolle Polyphosphat-bindender Proteine in der Immunantwort

Mittels Kombination von Partikel-basierten L-PolyP Bindungsstudien und Transkriptomanalyse konnten mehrere L-PolyP bindende und LPS- sowie L-PolyP regulierte Gene beziehungsweise Genprodukte identifiziert werden. Die immunologische Funktion dieser Kandidatengene sowie ihre Rolle in der Vermittlung der beobachteten L-PolyP-induzierten immunologischen Veränderungen in Makrophagen wurde nachfolgend untersucht. Hierfür wurden für drei der identifizierten Kandidaten, für die zudem eine Vielzahl zellulärer Signalfunktionen sowie immunologische Interaktoren bioinformatisch identifiziert werden konnten, näher untersucht. Für zwei der Gene (*MYADM*, *TMEM206*) wurden Knock-out Mäuse durch Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems generiert. Für *TMCO1* konnten entsprechende Knock-out Tiere von einem externen Anbieter erworben werden.

Die neu generierten Knock-out Stämme wurden bezüglich Fertilität und Viabilität untersucht. Hierbei konnten sie als fertil und lebensfähig klassifiziert werden. Für *TMCO1*-Knock-out Tiere konnte die bereits in der Literatur beschriebene Subfertilität und Subviabilität hingegen bestätigt werden (Sun et al., 2018), was insbesondere die Generierung für *in vivo*-Versuche geeigneter Gruppengrößen stark erschwerte. Aufgrund der geringen Anzahl erhaltener Tiere musste auf die Generierung von Knochenmarkschimären für die Durchführung eines ersten *in vivo*-Experiments zurückgegriffen werden. Im Rahmen der experimentellen Endotoxämie konnte eine veränderte Cytokinfreisetzung von MIP und, RANTES und IL-10 beobachtet werden. In Zukunft sollten diese Beobachtungen mit weiteren, idealerweise konditionalen Knock-out-Mäusen, bestätigt werden. Der Einsatz induzierbarer oder zelltypspezifischer Knock-out-Modelle ist anzuraten, um die beobachteten Fertilitätsprobleme zu umgehen. Hierfür könnte das *TMCO1* mit loxP-Stellen flankiert werden. Die Deletion von *TMCO1* in Makrophagen könnte dann durch Vekreuzung mit CD11b-Cre Mäusen erreicht werden (Ferron & Vacher, 2005). Darüber hinaus ist der Mechanismus der verstärkten Cytokinsekretion aufzuklären. In der Literatur wurden Beziehungen zwischen *TMCO1*-Verlust und aberranter Calcium-Signalgebung hergestellt (Wang et al., 2016). Möglicherweise sind die beobachteten Effekte auf eine Veränderung in intrazellulären, Calcium-abhängigen Signalwegen zurückzuführen. Intrazelluläre Calciumsignale könnten durch Verwendung von Fura-2 beispielsweise fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden (Grynkiewicz, et al., 1985). Denkbar ist auch eine Modulation von Cytoskelettdynamiken, die eine erleichterte Sekretion der intrazellulär produzierten Cytokine ermöglicht. Diese könnte durch eine Fluoreszenzfärbung der Cytoskelettbestandteile durch fluoreszenzmarkiertes Phalloidin, welches an F-Aktin bindet, fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden (Melak et al., 2017). Molekulare Interaktionen zwischen *TMCO1* und Cytoskelettcomponenten in diesem Zusammenhang könnten beispielsweise durch einen Proteinpulldown mit gegen *TMCO1* gerichtete Antikörper und anschließende Massenspektrometrische Identifizierung der *TMCO1*-gebundenen Fraktion oder fluoreszenzmikroskopisch mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), aufgeklärt werden.

Sowohl bei *TMEM206* also auch bei *MYADM* handelt es sich um Transmembranproteine. *TMEM206* ist dabei in der Plasmamembran lokalisiert. Für das Protein wurde eine Funktion als Bestandteil Protonen-aktivierter Chloridkanäle beschrieben (Ullrich et al., 2019). Diese Kanäle werden bei Erreichen eines subphysiologischen pH-Wertes im Gewebe von etwa

pH 6 aktiviert und sind auch für die Induktion des Säure-vermittelten Zelltods mitverantwortlich. Diese pH-Werte werden beispielsweise im Rahmen eines ischämischen Schlaganfalls im Gewebe erreicht, treten aber beispielsweise auch im endocytischen Weg von Makrophagen auf (Yang et al., 2019; Ullrich et al., 2019). Für TMEM206-Knock-out BMDM konnte eine verringerte iNOS-Induktion nach LPS-Stimulation sowie eine herabgesetzte Phagozytoseleistung festgestellt werden. Dies lässt auch eine verschlechterte Antwort der KO-Tiere auf eine lokale oder systemische Infektion *in vivo* vermuten. Darüber hinaus konnten Veränderungen im Anteil der Blutzellen beobachtet werden. Während der Anteil der Lymphozyten im Blut erhöht war (in der Milz wurde eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Zahl B-Lymphozyten festgestellt), wurde ein verringerter Anteil neutrophiler Granulozyten gefunden. In Zukunft sollten diese Tiere daher verstärkt sowohl in akuten als auch chronischen Entzündungsmodellen wie CLP und Pneumonie untersucht werden. Die Phagozytoseleistung und das zelluläre Überleben sollte in diesem Zusammenhang explizit bestimmt werden. Aufgrund der veränderten B-Zell-Zahlen ist auch eine Modulation der adaptiven Immunantwort durch TMEM206 denkbar. Eine Bestimmung des Verlaufs der B-Zellzahl im Rahmen einer Infektion wäre eine interessante Untersuchung, um zu sehen, ob die erhöhte Grundzahl auch in einer verstärkten klonalen Expansion als Antwort auf eine Infektion resultiert. Sowohl in Männchen als auch Weibchen des TMEM206-Knock-outs wurden signifikant geringere Blutglukosekonzentrationen gefunden als in entsprechenden Wildtypkontrollen. Möglicherweise erfüllt TMEM206 demnach auch Funktionen im zellulären Glukosemetabolismus. Die zelluläre Aufnahme von Glukose könnte in diesem Zusammenhang mittels 2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Desoxyglukose), einem fluoreszierenden Glukosederivat, verfolgt und quantifiziert werden (Zou et al., 2005). Einen Hinweis auf die zelluläre Verwendung der aufgenommenen Glukose und Nutzung relevanter Stoffwechselwege wie Glykolyse oder Oxidative Phosphorylierung könnte mittels Seahorse-Tests aufgeklärt werden. Hierbei lässt sich der Sauerstoffverbrauch der Zellen genauso quantifizieren wie die Ansäuerung des Mediums durch Stoffwechselprodukte wie Laktat (Mookerjee & Brand, 2015). Diese Parameter ermöglichen die Bewertung, welcher Stoffwechselweg von den Zellen präferiert wird.

Für MYADM-KO-Tiere wurde eine verringerte Neutrophilen- aber gleichermaßen erhöhte Lymphozyten- und Thrombozytenzahl im Blut beobachtet. Auch in der Milz konnten hier, wie bei TMEM206-KO-Tieren erhöhte B-Zellkonzentrationen festgestellt werden. Die Aufklärung des zugrundeliegenden Mechanismus sollte – wie für TMEM206-KO - Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Beispielsweise könnte dafür die Untersuchung der Reifung entsprechender Vorläuferzellen lichtmikroskopisch oder FACS-basiert erfolgen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die erhöhte Thrombozytenzahl aus einer veränderten Vorstufenreifung resultiert oder beispielsweise ein kompensatorischer Mechanismus für die verschobenen Immunzellpopulationen ist. MYADM wurde in diesem Zusammenhang bereits mit der Reifung der myeloiden Zellreihe in Verbindung gebracht (Dannaeus et al., 2005). Wie TMEM206-KO sollte MYADM aufgrund dieser Tatsache insbesondere in akuten *in vivo*-Modellen untersucht werden, die stark auf die Funktion von Immunzellen aus der myeloiden Reihe, wie Makrophagen, als Zellen der angeborenen Immunität, zurückgreifen. Insbesondere auch der Einfluss einer modulierten IL-1R2 und TGF β 2 Expression im MYADM-Knock-out sollte im Rahmen von *in vivo*-Modellen untersucht werden. Zudem sollte die auf der RNA-Ebene festgestellte verringerte Expression auch auf Proteinebene untersucht werden. Dies wäre beispielsweise über Western Blot oder FACS-Färbung gegen die Proteine möglich. Für die Untersuchung von IL-1R2 wären Entzündungsmodelle wie die CLP-Sepsis vermutlich gut geeignet. Für TGF β 2 ist die Verwendung von Fibrosemodellen anzuraten, da TGF β einer der Hauptregulatoren fibrotischer Zustände ist (Meng et al., 2016).

Für die TMC01-Knock-out Tiere wurde ein dramatischer Zuchtdefekt festgestellt. Für zukünftige Experimente sollte deshalb auf konditionale Knock-out-Mäuse zurückgegriffen werden. Insbesondere interessant wäre eine Wiederholung des Endotoxämie-modells oder die Durchführung einer CLP, wofür allerdings größere Tierzahlen von erfahrungsgemäß mindestens 10 Tieren pro Gruppe (Lan et al., 2017), anzuraten wären. Aufgrund der im Knock-out festgestellten, erhöhten systemischen Freisetzung von Chemokinen (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β) sollte dabei zudem erneut der Influx von Immunzellen in entzündete beziehungsweise infizierte Bereiche untersucht werden. Zur Aufklärung eines Mechanismus' der beobachteten Effekte sollte insbesondere die Calcium-Signalgebung der Immunzellen, beispielsweise mittels Fura-2 basierter Detektion intrazellulärer Calcium-Signale, untersucht werden (Grynkiewicz, et al., 1985).

Danksagung

Für das Gelingen dieser Arbeit bin ich sehr dankbar. Allen voran möchte ich deshalb meiner Familie und meiner Freundin für die private Unterstützung und den Rückhalt danken.

Mein Dank gilt darüber hinaus meinem Arbeitsgruppenleiter für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses anspruchsvollen Promotionsthemas sowie seine stetige Bemühung um eine umfassende Betreuung. Die Möglichkeit zur Anwendung moderner, im Labor noch nicht etablierter Methoden im Rahmen risikobehafteter Projekte, ist in der Wissenschaft keine Selbstverständlichkeit.

Darüber hinaus möchte ich meinem Vorgängerdoktoranden insbesondere für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen und Transkriptomanalysen danken, auf die im Rahmen dieser Arbeit für die Identifizierung zu untersuchender Kandidatengene zurückgegriffen wurde. Ebenfalls bedanken möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und grobe Einarbeitung am Anfang des Projekts, die einige Impulse für die Fortführungsversuche mit L-PolyP geliefert hat.

Weiterhin danken möchte ich den gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ihr offenes Ohr sowie die angeregten und fundierten wissenschaftlichen Diskussionen, die in diesem, nahezu familiären Rahmen möglich waren. Die regelmäßigen „Cookie and Coffee“-Sessions werde ich selbstverständlich vermissen.

Ich danke auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen des Instituts, insbesondere jenen, die den Ort so liebenswert gemacht haben: Danke für Eure Hilfsbereitschaft und die tatkräftige Mithilfe bei der Organisation der Zellkultur und des sonstigen Laborbetriebs.

Nicht zuletzt danken möchte ich meinen Gutachtern und der Prüfungskommission für die Bewertung dieser schriftlichen Arbeit und der folgenden Disputation.

Literaturverzeichnis

A

Abeyama K., Stern DM., Ito Y., et al. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1267–1274.

Abraham E., Laterre PF., Garg R., et al.: Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death. *N Engl J Med.* 2005 Sep 29;353(13):1332-41.

Achbergerová L, Nahálka J. Polyphosphate - an ancient energy source and active metabolic regulator. *Microb Cell Fact.* 2011;10:63.

Alanay Y, Ergüner B, Utine E, et al. TMCO1 deficiency causes autosomal recessive cerebrofaciothoracic dysplasia. *Am J Med Genet A.* 2014 Feb;164A(2):291-304.

AlQahtani A.D., O'Connor D., Domling A., Goda S.K. Strategies for the production of long-acting therapeutics and efficient drug delivery for cancer treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Vol. 113, May 2019, 108750.

Angus DC, van der Poll T: Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013; 369: 2063.
Aranda JF, Reglero-Real N, Kremer L, et al. MYADM regulates Rac1 targeting to ordered membranes required for cell spreading and migration. *Mol Biol Cell.* 2011;22(8):1252–1262.

Antoniak S. The coagulation system in host defense. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018;2(3):549–557.

Aparicio-Siegmund S, Garbers C. The biology of interleukin-27 reveals unique pro- and anti-inflammatory functions in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26:579–86.

Aranda JF, Reglero-Real N, Marcos-Ramiro B, et al. MYADM controls endothelial barrier function through ERM-dependent regulation of ICAM-1 expression. *Mol Biol Cell.* 2013;24(4):483–494.

Archibald FS, Fridovich I. Investigations of the state of the manganese in *Lactobacillus plantarum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1982; 215: 589–96.

Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6):1801.

Ayala A, Knotts JB, Ertel W, Perrin MM, Morrison MH; Chaudry IH: Role of interleukin 6 and transforming growth factor-beta in the induction of depressed splenocyte responses following sepsis. *Arch. Surg.* 128(1): 89-94, 1993.

Awasthi A., Carrier Y, Peron JP, et al., A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat. Immunol.*, 2007;8 (12),1380–1389.

B

Babes, V. Beobachtungen über die metachromatischen körperchen, sporenbildung, verzweigung, kolben- und kapsel-bildung pathogener bakterien. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.* 20, 412–420 (1895).

Baker CJ, Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate in thrombosis, hemostasis, and inflammation. *Res Pract Thromb Haemost*. 2018;3(1):18–25.

Bang, F. B. (1956). A bacterial disease of *limulus polyphemus*. *Bull. Johns. Hopkins. Hosp.* 98, 325-351.

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*; 315(5819):1709-12.

Bosmann M., Haggadone MD., Hemmila MR., et al.: Complement Activation Product C5a Is a Selective Suppressor of TLR4-Induced, but Not TLR3-Induced, Production of IL-27(p28) from Macrophages. *J Immunol*, 2012; 188:5086-5093

Bosmann M., Russkamp NF., Strobl B. et al.: Interruption of macrophage-derived IL-27(p28) production by IL-10 during sepsis requires STAT3 but not SOCS3. *J Immunol.*, 2014; 193(11):5668-77.

Bosmann M, Ward PA. Therapeutic potential of targeting IL-17 and IL-23 in sepsis. *Clin Transl Med*. 2012;1(1):4.

Breitkreutz B.J., Stark C., Tyers M.: The GRID: the general repository for interaction datasets. *Genome Biol*. 2003; 4:R23.

Boehm O., Zur B., Koch A., et al.: Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol Chem*. 2007 May;388(5):547-54.

Bone RC., Balk RA., Cerra FB, et al.: Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *CHEST*, Volume 101, Issue 6, 1644 – 1655, 1992.

Brandt E, Ludwig A, Petersen F, Flad HD. Platelet-derived CXC chemokines: old players in new games. *Immunol Rev* : 204–216, 2000.

Brown MR, Kornberg A. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(46):16085–16087.

Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*. 1992 Feb 7; 68(3):533-44.

Buchanan MM, Hutchinson M, Watkins LR, Yin H. Toll-like receptor 4 in CNS pathologies. *J Neurochem*. 2010;114:13–27.

Bürgi J, Xue B, Uversky VN, van der Goot FG. Intrinsic Disorder in Transmembrane Proteins: Roles in Signaling and Topology Prediction. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158594.

C

Calandra T, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Crit Rev Immunol*. 1997;17(1):77-88.

Cao J., et al., Activation of human bronchial epithelial cells by inflammatory cytokines IL-27 and TNF- α : implications for immunopathophysiology of airway inflammation. *J. Cell Physiol.* 223 (3) (2010) 788–797.

Carlsen H., Moskaug JØ., Fromm SH., Blomhoff R.: In vivo imaging of NF-kappa B activity. *J Immunol.* 2002 Feb 1;168(3):1441-6.

Carter SG., Karl DW.: Inorganic phosphate assay with malachite green: an improvement and evaluation. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1982, 7, pp. 7-13.

Chaudhari R., Joshi A., Srivastava R.: pH and Urea Estimation in Urine Samples using Single Fluorophore and Ratiometric Fluorescent Biosensors. *Sci Rep.* 2017; 7: 5840.

Chen J, Wang Z, Shen X, Cui X, Guo Y. Identification of novel biomarkers and small molecule drugs in human colorectal cancer by microarray and bioinformatics analysis. *Mol Genet Genomic Med.* 2019;7(7):e00713.

Chinnaiyan AM., Huber-Lang M., Kumar-Sinha C. et al.: Molecular Signatures of Sepsis Multiorgan Gene Expression Profiles of Systemic Inflammation. *Am J Pathol.* 2001; 159(4): 1199–1209.

Choi SH, Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate accelerates factor V activation by factor XIa. *Thromb. Haemost.*, 2014; 113: 599–604.

Choi SH, Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin. *Blood*, 2011; 118: 6963–70.

Choi MY, Wang Y, Wong LL, et al., The two PPX-GppA homologues from *Mycobacterium tuberculosis* have distinct biochemical activities. *PLoS One*, 2012; 7(8):e42561.

Chuang YM, Belchis DA, Karakousis PC. The polyphosphate kinase gene *ppk2* is required for *Mycobacterium tuberculosis* inorganic polyphosphate regulation and virulence. *MBio.* 2013; 4(3):e00039-13.

Concordet JP., Haeussler M.: CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W242–W245.

Cuajungco MP, Podevin W, Valluri VK, Bui Q, Nguyen VH, Taylor K. Abnormal accumulation of human transmembrane (TMEM)-176A and 176B proteins is associated with cancer pathology. *Acta Histochem.* 2012;114(7):705–712.

Cuenca A.G., Wynn J.L, Kelly-Scumpia KM., et al. Critical Role for CXC Ligand 10/CXC Receptor 3 Signaling in the Murine Neonatal Response to Sepsis. *INFECTION AND IMMUNITY*, 2011, p. 2746–2754.

Cui W., Taub DD., Gardner K.: qPrimerDepot: a primer database for quantitative real time PCR. *Nucleic Acids Res.*, 2007 Jan; 35: D805–D809.

D

Dalebroux ZD, Svensson SL, Gaynor EC, Swanson MS. ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 2010;74(2):171–199.

- Dannaeus K, Bessonova M, Jönsson JI. Characterization of the mouse myeloid-associated differentiation marker (MYADM) gene: promoter analysis and protein localization. *Mol Biol Rep.*, 2005;32(3):149-57.
- De Geer L., Engvall J. & Oscarsson A.: Strain echocardiography in septic shock – a comparison with systolic and diastolic function parameters, cardiac biomarkers and outcome. *Critical Care*, 2015, vol. 19, Article number:122.
- Degrandi D., Hoffmann R., Beuter-Gunia C., et al.: The proinflammatory cytokine-induced IRG1 protein associates with mitochondria. *J Interferon Cytokine Res.*, 2009; 29(1):55-67.
- Dejager L., Vandevyver S., Ballegeer M., et al. Pharmacological Inhibition of Type I Interferon Signaling Protects Mice Against Lethal Sepsis. *The Journal of Infectious Diseases*, 2014; 209(6):960–970.
- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al.: Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med.*, 2013;41(2):580-637.
- de Marco MC., Martín-Belmonte F., Kremer L., et al.: MAL2, a novel raft protein of the MAL family, is an essential component of the machinery for transcytosis in hepatoma HepG2 cells. *J Cell Biol.*, 2002;159(1):37–44. doi:10.1083/jcb.200206033
- den Hartog G., van Altena C., Savelkoul H. F., van Neerven R. J.: The mucosal factors retinoic acid and TGF-beta1 induce phenotypically and functionally distinct dendritic cell types. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2013, 162, 225–236.
- Denstaedt SJ., Singer BH., Standiford TJ.: Sepsis and Nosocomial Infection: Patient Characteristics, Mechanisms, and Modulation. *Front Immunol.*, 2018; 9: 2446.
- de Wit NJ, Rijntjes J, Diepstra JH, et al. Analysis of differential gene expression in human melanocytic tumour lesions by custom made oligonucleotide arrays. *Br J Cancer.*, 2005; 92(12):2249-61.
- Dinarvand P, Hassanian SM, Qureshi SH, et al. Polyphosphate amplifies proinflammatory responses of nuclear proteins through interaction with receptor for advanced glycation end products and P2Y1 purinergic receptor. *Blood.* 2014;123(6):935–945.
- Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.*, 2009;27:519-50.
- Dinarello CA. Blocking interleukin-1 β in acute and chronic autoinflammatory diseases. *J Intern Med.*, 2011;269(1):16–28.
- Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(8):633–652.
- Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol.*, 2005;3: 251–261.

Docampo R, Ulrich P, Moreno SN. Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010;365(1541):775–784.

Dolin, H. H., Papadimos, T. J., Chen, X., & Pan, Z. K. (2019). Characterization of Pathogenic Sepsis Etiologies and Patient Profiles: A Novel Approach to Triage and Treatment. *Microbiology Insights*, 2019;12: 1178636118825081.

Donati A., Domizi R., Damiani E., Adrario E., Pelaia P., Ince C.: From macrohemodynamic to the microcirculation. *Crit Care Res Pract.*, 2013;2013:892710.

Dong K, Yao N, Pu Y, et al. Genomic scan reveals loci under altitude adaptation in Tibetan and Dahe pigs. *PLoS One.* 2014;9(10):e110520.

Dowling JK., Mansell A.: Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. *Clin Transl Immunology.*, 2016; 5(5): e85.

Duan Y, Jia Y, Wang T, et al. Potent therapeutic target of inflammation, virus and tumor: focus on interleukin-27. *Int Immunopharmacol.*, 2015;26:139–46.

Dubey VK, Jagannadham MV Differences in the unfolding of procerain induced by pH, guanidine hydrochloride, urea, and temperature. *Biochemistry.*, 2003; 42(42):12287-97.

E

Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, et al. Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.*, 2002;166(9):1197–1205.

ElAzzouny M, Tom CT, Evans CR, et al. Dimethyl Itaconate Is Not Metabolized into Itaconate Intracellularly. *J Biol Chem.*, 2017;292(12):4766–4769.

Ellrodt AG., Riedinger MS., Kimchi A., et al.: Left ventricular performance in septic shock: reversible segmental and global abnormalities. *Am Heart J.*, 1985;110:402–9.

Engel C., Brunkhorst FM., Bone HG., et al.: Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med.*, 2007; 33: 606–18

F

Feng L, Xue D, Chen E, et al. HMGB1 promotes the secretion of multiple cytokines and potentiates the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the Ras/MAPK signaling pathway. *Exp Ther Med.*, 2016;12(6):3941–3947.

Ferrari G., Terushkin V., Wolff M., et al.: TGF-beta1 induces endothelial cell apoptosis by shifting VEGF activation of p38 (MAPK) from the prosurvival p38beta to proapoptotic p38alpha. *Mol. Cancer Res.*, 2012,10, 605–614.

Ferron M., Vacher J.: Targeted expression of Cre recombinase in macrophages and osteoclasts in transgenic mice. *Genesis*, 2005;41(3):138-45.

Fineran PC, Charpentier E. Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: acquisition of new information. *Virology*, 2012;434:202–209.

Fleischmann C., Thomas–Rueddel, DO.; et al. Hospital incidence and mortality rates of sepsis — an analysis of hospital episode (DRG) statistics in Germany from 2007 to 2013 *Dtsch Arztebl Int.*, 2016; 113(10): 159-66.

Fotakis G., Timbrell JA.. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160 (2006) 171–177.

Fraley CD, Rashid MH, Lee SS, et al. A polyphosphate kinase 1 (ppk1) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2007;104(9):3526–3531.

G

Gao J., Zhu Y., Nilsson M., and Sundfeldt K.: TGF-beta isoforms induce EMT independent migration of ovarian cancer cells. *Cancer Cell Int.*, 2014, 14, 72.

García-Arnandis I, Guillén MI, Gomar F, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Alcaraz MJ. High mobility group box 1 potentiates the pro-inflammatory effects of interleukin-1 β in osteoarthritic synoviocytes. *Arthritis Res Ther.*, 2010;12(4):R165.

George M, Iramiot JS, Muhindo R, Olupot-Olupot P, Nanteza A. Bacterial Aetiology and Antibiotic Susceptibility Profile of Post-Operative Sepsis among Surgical Patients in a Tertiary Hospital in Rural Eastern Uganda. *Microbiol Res J Int.* 2018;24(2):MRJL.41690.

Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol.* 2001; 2:108–115.

Ghodrati F, Mehrabian M, Williams D, et al. The prion protein is embedded in a molecular environment that modulates transforming growth factor β and integrin signaling. *Sci Rep.* 2018;8(1):8654.

Gibbison B, López-López JA, Higgins JP, et al. Corticosteroids in septic shock: a systematic review and network meta-analysis. *Crit Care.*, 2017;21(1):78.

Gleissner CA, Shaked I, Erbel C, Bockler D, Katus HA, Ley K. CXCL4 downregulates the atheroprotective hemoglobin receptor CD163 in human macrophages. *Circ Res.*, 2010; 203–211.

Gleissner CA, Shaked I, Little KM, Ley K. CXC chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophages. *J Immunol.*, 2010:4810–4818.

Golub T, Pico C Spatial control of actin-based motility through plasmalemmal PtdIns(4,5)P₂-rich raft assemblies. *Biochem Soc Symp.*, 2005; (72):119-27.

Gomes R.N., Teixeira-Cunha M.G.A., Figueiredo R.T. Bacterial Clearance in Septic Mice is Modulated By MCP-1/CCL2 and Nitric Oxide. *Shock*, 2013; 39(1): 63–69.

Gonnert, FA, Recknagel P, Seidel M, et al. Characteristics of Clinical Sepsis Reflected in a Reliable and Reproducible Rodent Sepsis Model. *Journal of Surgical Research*, 2011;170, e123–e134.

Gray MJ, Wholey WY, Wagner NO, et al. Polyphosphate is a primordial chaperone. *Mol Cell.*, 2014;53(5):689–699.

Greco E, Lupia E, Bosco O, Vizio B, Montrucchio G. Platelets and Multi-Organ Failure in Sepsis. *Int J Mol Sci.*, 2017;18(10):2200.

Gregg C, Zhang J, Butler JE, Haig D, Dulac C. Sex-specific parent-of-origin allelic expression in the mouse brain. *Science*, 2010a;329:682–685.

Gregg C, Zhang J, Weissbourd B, Luo S, Schroth GP, Haig D, Dulac C. High-resolution analysis of parent-of-origin allelic expression in the mouse brain. *Science*, 2010b;329:643–648.

Grommes J, Alard JE, Drechsler M, et al. Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.*, 2012;628–636.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985) A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.*, 260: 3440–3450.

Günther W, Lüchow A, Cluzeaud F, Vandewalle A, Jentsch TJ. ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1998;95(14):8075–8080.

Guha S., Coffey EE., Lu W., et al.: Approaches for detecting lysosomal alkalization and impaired degradation in fresh and cultured RPE cells: evidence for a role in retinal degenerations. *Exp Eye Res.*, 2014;126:68–76.

H

Hall CJ, Boyle RH, Astin JW, et al.: Immunoresponsive gene 1 augments bactericidal activity of macrophage-lineage cells by regulating β -oxidation-dependent mitochondrial ROS production. *Cell Metab.*, 2013 Aug 6; 18(2):265-78.

Hamano, S., K. Himeno, Y. Miyazaki, et al. 2003. WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity*, 2003;19: 657–667.

Harada K, Shiba T, Doi K, et al. Inorganic polyphosphate suppresses lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in macrophages. *PLoS One.*, 2013;8(9):e74650.

Hassanian SM, Dinarvand P, Smith SA, Rezaie AR. Inorganic polyphosphate elicits pro-inflammatory responses through activation of the mammalian target of rapamycin complexes 1 and 2 in vascular endothelial cells. *J Thromb Haemost.* 2015;13(5):860–871.

Hawiger J.: Heartfelt sepsis: microvascular injury due to genomic storm. *Kardiol Pol.*, 2018;76(8):1203-1216.

Hawlich H., Belkaid Y., Baelder R., et al.: C5a Negatively Regulates Toll-like Receptor 4-Induced Immune Responses. *Immunity*, 2005;22(4):415-426.

Heming N, Lamothe L, Ambrosi X, Annane D. Emerging drugs for the treatment of sepsis. *Expert Opin Emerg Drugs.*, 2016;21(1):27-37.

Hiraki S, Ono S, Tsujimoto H, Kinoshita M, Takahata R, Miyazaki H, et al. Neutralization of interleukin-10 or transforming growth factor-beta decreases the percentages of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in septic mice, thereby leading to an improved survival. *Surgery*, 2012;151(2):313–22.

Hoffmann B., Kosegarten H.: FITC-dextran for measuring apoplast pH and apoplastic pH gradients between various cell types in sunflower leaves. *Physiologia Plantarum*, 1995;95(3):327–335.

Hofmann K., Stoffel W.: TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1993, 374,166.

Holst B., Raby A-C., Hall J.E., Labéta M.O. Complement takes its Toll: an inflammatory crosstalk between Toll-like receptors and the receptors for the complement anaphylatoxin C5a. *Anaesthesia*, 2012;67(1):60-64.

Hooftman A, O'Neill L.A.J. The Immunomodulatory Potential of the Metabolite Itaconate. *Trends in Immunology*, 2019;40:8; 687-698.

Horikawa K, Takatsu K. Interleukin-5 regulates genes involved in B-cell terminal maturation. *Immunology*, 2006;118(4):497–508.

Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010;327:167–170.

Hotchkiss RS., Monneret G., Payen D.: Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol.*, 2013; 13(12): 862–874.

Huttlin EL., Bruckner RJ., Paulo JA. et al.: Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks *Nature*, 2017;545, 505–509.

Huttlin EL, Jedrychowski MP, Elias JE, et al. A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell*, 2010;143(7):1174–1189.

I

Ince C., Mayeux PR., Nguyen T., et al.: THE ENDOTHELIUM IN SEPSIS. *Shock*, 2016;45(3):259–270.

Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *J Bacteriol.*, 1987;169(12):5429–5433.

Iskander KN., Osuchowski MF., Stearns-Kurosawa DJ., et al. Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiol Rev.*, 2013;93(3):1247–1288.

Itaya K., Ui M.: A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate. *Clin. Chim. Acta*, 1966;14, 361-366.

J

Jahid IK, Silva AJ, Benitez JA. Polyphosphate stores enhance the ability of *Vibrio cholerae* to overcome environmental stresses in a low-phosphate environment. *Appl Environ Microbiol.*, 2006;72(11):7043-9.

Jamal UM., Joe Y., Kim SK., et al.: IRG1 induced by heme oxygenase-1/carbon monoxide inhibits LPS-mediated sepsis and pro-inflammatory cytokine production. *Cell Mol Immunol.*, 2016;13(2):170–179.

Janeway CA., Travers P., Walport M., Shlomchik MJ.. Immunobiology, 5th edition Garland Science, New York, 2001.

Jentsch TJ. Chloride and the endosomal-lysosomal pathway: emerging roles of CLC chloride transporters. *J Physiol.* 2007;578(Pt 3):633–640.

Jeong TH, Son YJ, Ryu HB, et al. Soluble expression and partial purification of recombinant human erythropoietin from *E. coli*. *Protein Expr Purif.*, 2014;95:211-8.

Jianwei Li, Caizhi Liu, Yuheng Li, et al. TMCO1-mediated Ca^{2+} leak underlies osteoblast functions via CaMKII signaling. *Nature Communications*, 2019;10, 1589.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012;337(6096):816–821.

Johnson DE, Ostrowski P, Jaumouillé V, Grinstein S. The position of lysosomes within the cell determines their luminal pH. *J Cell Biol.*, 2016;212(6):677–692.

Johnston WL, Catton CN, Swallow CJ. Unbiased data mining identifies cell cycle transcripts that predict non-indolent Gleason score 7 prostate cancer. *BMC Urol.*, 2019;19(1):4.

K

Kastelein R.A., Saris C., Hunter C.A. 2003. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity*, 2003;19: 645–655.

Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014;5:461.

Knapp S., Thalhammer F., Locker GJ., et al.: *Prognostic value of MIP-1 alpha, TGF-beta 2, sELAM-1, and sVCAM-1 in patients with Gram-positive sepsis. Clin Immunol Immunopathol* 87(2): 139-144, 1998.

Kornberg A, Rao NN., Ault-Riche D.: Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Prog Mol Subcell Biol.*, 1999;23:1-18.

Kim KS, Rao NN, Fraley CD, Kornberg A Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2002 May 28; 99(11):7675-80.

Koss M, Pfeiffer GR 2nd, Wang Y, et al. Ezrin/radixin/moesin proteins are phosphorylated by TNF-alpha and modulate permeability increases in human pulmonary microvascular endothelial cells. *J Immunol.*, 2006 Jan 15;176(2):1218-27.

Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.*, 2001 Jan 19;305(3):567-80.

Kumar P., Nagarajan A., Uchil PD.: Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc.*, 2018;1; (6).

Kumble KD, Kornberg A. Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. *J Biol Chem.*, 1995 Mar 17;270(11):5818-22.

L

Lampropoulou V, Sergushichev A, Bambouskova M, et al. Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cell Metab.*, 2016;24(1):158–166.

Lan KC, Chao SC, Wu HY, et al. Salidroside ameliorates sepsis-induced acute lung injury and mortality *via* downregulating NF- κ B and HMGB1 pathways through the upregulation of SIRT1. *Scientific Reports*, 2017; 7, 12026.

Langsdorf C., Beacham D., Berlier J., et al. Illuminating Endocytosis with Targeted pH-sensitive Fluorescent Compounds, ASCB 2013 Poster B1994; <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MBD/posters/endocytosis-ph-sensitive-fluorescent-compounds-poster.pdf>, abgerufen am 27.08.2019

Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb J.*, 2004; 18: 816–827.

Levy MM., Artigas A., Phillips GS., et al.: Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study *Lancet Infect Dis.*, 2012; 12: 919–24.

Liliensiek B., Weigand MA., Bierhaus A., et al.: Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response- *J. Clin. Invest.*, 2004;113:1641–1650.

Lilly. Lilly Announces Withdrawal of Xigris Following Recent Clinical Trial Results. 2011. <https://investor.lilly.com/news-releases/news-release-details/lilly-announces-withdrawal-xigris-following-recent-clinical>, Link abgerufen am 21.08.2019.

Li N., Xie C., Lu NH.: Transforming growth factor- β : an important mediator in *Helicobacter pylori*-associated pathogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2015; 5:77.

Li M, Han Y, Zhou H, et al. Transmembrane protein 170B is a novel breast tumorigenesis suppressor gene that inhibits the Wnt/ β -catenin pathway. *Cell Death Dis.*, 2018;9(2):91.

Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 2010; 327(5961):46-50.

Livermore TM., Chubb JR., Saiardi A. Developmental accumulation of inorganic polyphosphate affects germination and energetic metabolism in *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2016;113(4):996–1001.

Lonetti A., Szijgyarto Z., Bosch D., et al. Identification of an Evolutionarily Conserved Family of Inorganic Polyphosphate Endopolyphosphatases. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011;286(37), 31966 –31974.

Lu, B., B. J. Rutledge, L. Gu, J. Fiorillo, N. W. Lukacs, S. L. Kunkel, R. North, C. Gerard, and B. J. Rollins. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 1998; 187: 601–608.

Luan HH, Medzhitov R. Food Fight: Role of Itaconate and Other Metabolites in Antimicrobial Defense. *Cell Metab.*, 2016;24(3):379–387.

Luo W., Jiang H., Tang X., Liu W.: A reversible ratiometric two-photon lysosome targeted probe for real-time monitoring of pH changes in living cells. *Journal of Materials Chemistry B*; 2017.

Luo CJ, Luo F, Zhang L, et al. Knockout of interleukin-17A protects against sepsis-associated acute kidney injury. *Ann Intensive Care.*, 2016;6(1):56.

Luster AD. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.*, 1998;338:436—445.

M

Ma L, Ouyang Q, Werthmann GC, Thompson HM, Morrow EM. Live-cell Microscopy and Fluorescence-based Measurement of Luminal pH in Intracellular Organelles. *Front Cell Dev Biol.*, 2017;5:71.

Makarova KS, Koonin EV. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods Mol Biol.*, 2015;1311:47–75.

Mañes S, Ana Lacalle R, Gómez-Moutón C, Martínez-A C. From rafts to crafts: membrane asymmetry in moving cells. *Trends Immunol.*, 2003 Jun;24(6):320-6.

Marchetti A., Lelong E., Cosson P.: A measure of endosomal pH by flow cytometry in *Dictyostelium*, *BMC Research Notes*, 2009, Vol. 2, 7.

Marim FM, Silveira TN, Lima DS Jr, Zamboni DS. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PLoS One*, 2010;5(12):e15263.

Markwart R., Condotta SA., Requardt RP., et al.: Immunosuppression after Sepsis: Systemic Inflammation and Sepsis Induce a Loss of Naïve T-Cells but No Enduring Cell-Autonomous Defects in T-Cell Function. *PLoS ONE*, 2014, 9(12): e115094.

- Marshall JC., Maier RV., Jimenez M., Dellinger EP.: Source control in the management of severe sepsis and septic shock: an evidence-based review. *Crit Care Med.*, 2004;32(11 Suppl):S513-26.
- Matsuda N.; Hattori Y.: Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS): Molecular Pathophysiology and Gene Therapy. *J Pharmacol Sci.*, 2006; 101, 189 – 198.
- Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, et al. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. *J Immunol.*, 1999; 163:6148–6154.
- Mazzaccara, C, Labruna G, Cito G, Scarfo M, De Felice M. 2008, Age related reference intervals of the main biochemical and hematological parameters in 120C57BL/6J, 129SV/EV and C3H/HeJ Mouse Strains. *PLoS ONE*, 3:e3772.
- McIntyre CA., PhD and Gil Reinin Reduction in Endotoxin Levels After Performing the Prepare for Aseptic Sort Procedure on the BD FACSAria II Flow Cytometer; Application Note, BD Biosciences, 2009; https://wwwbdbiosciences.com/documents/FacsariaII_Endotoxin.pdf, abgerufen am 26.08.2019.
- McLane MW, Hatzidimitriou G, Yuan J, et al. Heating induces aggregation and decreases detection of serotonin transporter protein on western blots. *Synapse*, 2007;61(10):875-6.
- Mei SH, Haitzma JJ, Dos Santos CC, et al. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.*, 2010;182(8):1047-57.
- Melak M, Plessner M, Robert Grosse R. Actin visualization at a glance. *Journal of Cell Science*, 2017, 0, 1-6.
- Mellhammar L, Wullt S, Lindberg Å, Lanbeck P, Christensson B, Linder A. Sepsis Incidence: A Population-Based Study. *Open Forum Infect Dis.*, 2016;3(4):ofw207.
- Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol.*, 2016;12(6):325-38.
- Middleton E.A., Weyrich A.S., Zimmerman G.A., Platelets in Pulmonary Immune Responses and Inflammatory Lung Diseases. *Physiol Rev.*, 2016; 96(4): 1211–1259.
- Miksa M, Komura H, Wu R, Shah KG, Wang P. A novel method to determine the engulfment of apoptotic cells by macrophages using pHrodo succinimidyl ester. *J Immunol Methods.*, 2009;342(1-2):71–77.
- Mills EL, Kelly B, Logan A, et al. Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell*, 2016;167(2):457-470.e13.
- Mills EL, Ryan DG, Prag HA, et al. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature*, 2018;556(7699):113–117.

Moding E., Hellyer J., Rank K., Lostroh P., Brasuel M.: Characterization of PEBBLEs as a Tool for Real-Time Measurement of Dictyostelium discoideum Endosomal pH. *Journal of Sensors*, vol. 2009, Article ID 235158, 4 pages.

Moerer O., Burchardi H.: Kosten der Sepsis. *Der Anaesthetist*, Sonderheft 1/2006.

Mogensen TH.: Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev.*, 2009; 22(2): 240–273.

Mookerjee SA, Brand MD. Measurement and Analysis of Extracellular Acid Production to Determine Glycolytic Rate. *J Vis Exp.*, 2015;(106):e53464.

Moreno SN., Docampo R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. *J Eukaryot Microbiol.*, 2009;56(3):208–213.

Morrissey JH, Smith SA. Polyphosphate as modulator of hemostasis, thrombosis, and inflammation. *J Thromb Haemost.*, 2015;13 Suppl 1(0 1):S92–S97.

Mutch NJ., Engel R., Uitte de Willige S., et al. Polyphosphate modifies the fibrin network and down-regulates fibrinolysis by attenuating binding of tPA and plasminogen to fibrin. *Blood*, 2010; 115: 3980–8.

N

Nadel S., Goldstein B., Williams MD., et al.: REsearching severe Sepsis and Organ dysfunction in children REsearching severe Sepsis and Organ dysfunction in children: a gLocal perspective (RESOLVE) study group. Drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis: a multicentre phase III randomised controlled trial. *Lancet*, 2007;369:836–843.

Nakano Y, Kasahara T, Mukaida N, et al. Protection against lethal bacterial infection in mice by monocyte-chemotactic and -activating factor. *Infect Immun.*, 1994; 62:377–383.

Neurath MF. New therapies for sepsis: focus on the interleukin (IL)12 family member IL27. *Ann Rheum Dis.*, 2007;66(Suppl 3):iii29–31.

Nickless A., Bailis JM., You Z.: Control of gene expression through the nonsense-mediated RNA decay pathway *Cell Biosci.*, 2017; 7: 26.

Nikel PI, Chavarría M, Martínez-García E, et al. Accumulation of inorganic polyphosphate enables stress endurance and catalytic vigour in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microb Cell Fact.*, 2013; 12():50.

O

Oh SA, Li MO. TGF-beta: guardian of T cell function. *Journal of immunology*. 2013;191(8):3973–9.

Okada T, Suzuki H. Toll-like receptor 4 as a possible therapeutic target for delayed brain injuries after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neural Regen Res*. 2017;12(2):193–196.

Okusawa S, Dinarello CA, Yancey KB, *et al.* C5a induction of human interleukin 1: Synergistic effect with Endotoxin or Interferon γ . *Journal of Immunology*, 1987; 139: 2635–40.

Oldenburg M., Krüger A., Ferstl R., *et al.*, TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science*, 2012 Aug 31;337(6098):1111-5.

Opal SM, Fisher CJ, Jr, Dhainaut JF, *et al.* Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Crit Care Med.* 1997;25(7):1115–24.

Opal SM, Laterre PF, Francois B *et al.* Effect of Eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA*, 2013, 309(11), 1154–1162.

Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front. Immunol.*, 2019;10,1084.

Overhaus M, Moore BA, Barbato JE, *et al.* Biliverdin protects against polymicrobial sepsis by modulating inflammatory mediators. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2006;290:G695–703.

P

Palasca O., Santos A., Stolte C., *et al.*: TISSUES 2.0: an integrative web resource on mammalian tissue expression. *Database (Oxford)*., 2018; 2018:bay003.

Papic N, Maxwell CI, Delker DA, Liu S, Heale BS, Hagedorn CH. RNA-sequencing analysis of 5' capped RNAs identifies many new differentially expressed genes in acute hepatitis C virus infection. *Viruses*, 2012;4(4):581–612.

Pappalardo F., Crivellari M., Di Prima AL., *et al.*: Protein C zymogen in severe sepsis: a double-blinded, placebo-controlled, randomized study. *Intensive Care Med.*, 2016;42(11):1706-1714.

Parker MM., Shelhamer JH., Bacharach SL., *et al.*: Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med.*, 1984;100:483–90.

Pedrazza L, Cunha AA, Luft C, *et al.* Mesenchymal stem cells improves survival in LPS-induced acute lung injury acting through inhibition of NETs formation. *J Cell Physiol.*, 2017;232(12):3552-3564.

Penney CL.: A simple micro-assay for inorganic phosphate. *Anal. Biochem.*, 1976;75, 201-210.

Peters VA, Joesting JJ, Freund GG. IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation. *Brain Behav Immun.*, 2013;32:1–8.

Petitou M., Tuy F., Rosenfeld CA.: Simple procedure for organic phosphorus determination from phospholipids. *Anal. Biochem.*, 1978; 91, 350-353.

Pettersson M, Danneus K, Nilsson K, Jönsson JI. Isolation of MYADM, a novel hematopoietic-associated marker gene expressed in multipotent progenitor cells and up-regulated during myeloid differentiation. *J Leukoc Biol.*, 2000; 67(3):423-31.

Piwon N, Günther W, Schwake M, et al. CIC-5 Cl⁻-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature*, 2000;408(6810):369-73.

Poelstra K, Bakker WW, Klok PA, et al. A physiologic function for alkaline phosphatase: endotoxin detoxification. *Lab Invest.*, 1997;76(3):319-27.

Pokhrel A., Lingo J. C., Wolschendorf F., Gray M. J.: Assaying for Inorganic Polyphosphate in Bacteria. *J. Vis. Exp.*, 2019; (143), e58818.

Q

Qian L, Wei SJ, Zhang D, et al. Potent anti-inflammatory and neuroprotective effects of TGF- β 1 are mediated through the inhibition of ERK and p47phox-Ser345 phosphorylation and translocation in microglia. *J Immunol.*, 2008;181(1):660–668.

R

Ramnath RD., Ng SW., Guglielmottib A., Bhatia M., Role of MCP-1 in endotoxemia and sepsis. *International Immunopharmacology*, 2008, 8, 810–818.

Rashid MH, Rao NN, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *J Bacteriol.*, 2000;182(1):225–227.

Rashid MH, Rumbaugh K, Passador L, et al.: Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2000; 97(17):9636-41.

Rathore JS., Wang Y., Protective role of Th17 cells in pulmonary infection. *Vaccine*, 2016; 34, 1504–1514.

Rice TW, Wheeler AP, Bernard GR et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of TAK-242 for the treatment of severe sepsis. *Crit. Care Med.*, 2010;38(8), 1685–1694.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 2003;302(5651):1704-9.

Rinchai D, Khaenam P, Kewcharoenwong C, et al. Production of interleukin-27 by human neutrophils regulates their function during bacterial infection. *Eur J Immunol.*, 2012;42:3280–90.

Rittirsch D., Flierl MA., Ward PA.: Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol.*, 2008 October ; 8(10): 776–787.

Röwe J.: Inorganic polyphosphates – novel modulators of immune response. Dissertationsschrift, Mainz, 2018.

Roewe J, Higer M, Riehl DR, et al. Neuroendocrine modulation of IL-27 in macrophages. *J Immunol.* 2017;199:2503–14.

Rossaint J, Herter JM, Van Aken H, Napirei M, Doring Y, Weber C, Soehnlein O, Zarbock A. Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation. *Blood*, 2014; 2573–2584.

Rubio-Gayosso I., Platts SH., Duling BR.: Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2006;290:H2247–H2256.

Rungta RL., Choi HB., Tyson JR.: The Cellular Mechanisms of Neuronal Swelling underlying Cytotoxic Edema. *Cell*, 2015;161(3):610-621.

S

Samuels JM, Moore HB, Moore EE. Coagulopathy in Severe Sepsis: Interconnectivity of Coagulation and the Immune System. *Surg Infect (Larchmt)*., 2018;19(2):208–215.

Sánchez-Pulido, L., Martín-Belmonte, F., Valencia, A.; Alonso, M. A. (2002). *MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. Trends Biochem. Sci.*, 2002; 27, 599–601.

Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, et al. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell*, 2008;135(3):510-23.

Sanz-Moreno V, Marshall CJ. The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration. *Curr Opin Cell Biol.*, 2010; 22(5):690-6.

Sato-Numata K, Numata T, Okada T, Okada Y. Acid-sensitive outwardly rectifying (ASOR) anion channels in human epithelial cells are highly sensitive to temperature and independent of ClC-3. *Pflugers Arch.*, 2013;465(11):1535-43.

Scheuerer B, Ernst M, Durrbaum-Landmann I, et al. The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood*, 2000;1158–1166.

Shi Y., Meng X., Yang H., et al., Lysosome-specific sensing and imaging of pH variations *in vitro* and *in vivo* utilizing a near-infrared boron complex. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019; Issue 22.

Shi CS., Shi GY., Hsiao HM., et al. Lectin-like domain of thrombomodulin binds to its specific ligand Lewis Y antigen and neutralizes lipopolysaccharide-induced inflammatory response. *Blood*, 2008;112(9):3661–3670.

Simons K, Ikonen E Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 1997 Jun 5; 387(6633):569-72.

Singer M., Deutschman CS., Seymour CW., et al.: The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 2016; 315: 801-10

Singh K, Shandilya M, Kundu S, Kayastha AM. Heat, Acid and Chemically Induced Unfolding Pathways, Conformational Stability and Structure-Function Relationship in Wheat α -Amylase. *PLoS One*, 2015;10(6):e0129203.

Singh, U. P., et al. 2008. CXCL10 T cells and NK cells assist in the recruitment and activation of CXCR3 and CXCL11 leukocytes during Mycobacteria-enhanced colitis. *BMC Immunol.*, 9:25.

Singh, U. P., C. Venkataraman, R. Singh, and J. W. Lillard, Jr. CXCR3 axis: role in inflammatory bowel disease and its therapeutic implication. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, 2007; 7:111–123.

Smith SA, Choi SH, Davis-Harrison R, et al. Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. *Blood*, 2010;116(20):4353–4359.

Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, Rohloff P, Docampo R, Morrissey JH. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103: 903–8.

Smith SA, Choi SH, Davis-Harrison R, Huyck J, Boettcher J, Rienstra CM, Morrissey JH. Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. *Blood*, 2010; 116: 4353–9.

Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate enhances fibrin clot structure. *Blood*, 2008; 112: 2810–6.

Smith SM., Wunder MB, Norris DA et al.: A Simple Protocol for Using a LDH-Based Cytotoxicity Assay to Assess the Effects of Death and Growth Inhibition at the Same Time *PLoS One*. 2011; 6(11): e26908.

Sommer K, Sander AL, Albig M, et al. Delayed wound repair in sepsis is associated with reduced local pro-inflammatory cytokine expression. *PLoS One*. 2013;8(9):e73992.

Stetson D.B., Medzhitov R. Type I Interferons in Host Defense. *Immunity*, 2006; 25(3):373-381.

Strelko CL, Lu W, Dufort FJ, et al. Itaconic acid is a mammalian metabolite induced during macrophage activation. *J Am Chem Soc.*, 2011 Oct 19; 133(41):16386-9.

Sun Z., Zhang H., Wang X., et al.: TMCO1 is essential for ovarian follicle development by regulating ER Ca²⁺ store of granulosa cells. *Cell Death & Differentiation*, 2018, 25, 1686–1701.

Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, 1983 May;33(1):25-35.

T

Takahashi H., Tsuda Y., Takeuchi D., Kobayashi M., Herndon DN., Suzuki F.: Influence of systemic inflammatory response syndrome on host resistance against bacterial Infections. *Crit Care Med.*, 2004 32:1879–85.

Takashima K, Matsunaga N, Yoshimatsu M, Hazeki K, Kaisho T, Uekata M, et al. Analysis of binding site for the novel small-molecule TLR4 signal transduction inhibitor TAK-242 and its therapeutic effect on mouse sepsis model. *Br J Pharmacol.*, 2009, 157(7):1250-62.

Takeda, K., S. Akira. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.*, 2004; 16:3–9.

Tangsudjai S., Pudla M., Limposuwan K., et al.: Involvement of the MyD88-independent pathway in controlling the intracellular fate of *Burkholderia pseudomallei* infection in the mouse macrophage cell line RAW 264. *Microbiol Immunol.* 2010; 54(5):282-90.

Taub DD. Chemokine–leukocyte interactions. The voodoo that they do so well. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 1996;7:355–76.

Toscano MG, Ganea D, Gamero AM. Cecal ligation puncture procedure. *J Vis Exp.*, 2011;(51):2860.

Tourinho-Barbosa R, Srougi V, Nunes-Silva I, et al. Biochemical recurrence after radical prostatectomy: what does it mean?. *Int Braz J Urol.*, 2018;44(1):14–21. doi:10.1590/S1677-5538.IBJU.2016.0656.

Travers RJ, Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate, platelets, and coagulation. *Int J Lab Hematol.*, 2015;37 Suppl 1(0 1):31–35.

Tsirigos KD, Peters C, Shu N, Käll L and Elofsson A (2015) The TOPCONS web server for combined membrane protein topology and signal peptide prediction. *Nucleic Acids Research* 43 (Webserver issue), W401-W407.

Tu E, Chia PZ, Chen W. TGFbeta in T cell biology and tumor immunity: Angel or devil? *Cytokine & growth factor reviews*, 2014.

U

Uguccioni, M., M. D'Apuzzo, M. Loetscher, B. Dewald, and M. Baggiolini. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *Eur. J. Immunol.*, 1995; 25: 64–68.

Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, et al, 2015. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 2015;347(6220):1260419.

Ulloa, L., Ochani M., Yang H., et al.: Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002, 99:12351–12356

Ullrich F., Blin S., Lazarow K., et al.: Identification of TMEM206 proteins as pore of PAORAC/ASOR acid-sensitive chloride channels. *eLife*, 2019 ;8:e49187

UniProt Consortium. The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Database issue):D190–D195.

V

Veitch RA., Liu Y., Zienkiewicz J., et al.: Survival, bacterial clearance and thrombocytopenia are improved in polymicrobial sepsis by targeting nuclear transport shuttles. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179468.

Vergne I, Constant P, Laneelle G: Phagosomal pH determination by dual fluorescence flow cytometry. *Anal Biochem*, 1998, **255(1)**:127-132.

Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol*, 2012: 5–30.

Vieira da Silva Pellegrina D, Severino P, Vieira Barbeiro H, et al. Septic Shock in Advanced Age: Transcriptome Analysis Reveals Altered Molecular Signatures in Neutrophil Granulocytes. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128341.

W

Wang XJ, Han G, Owens P, Siddiqui Y, Li AG. Role of TGF beta-mediated inflammation in cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc.*, 2006; 11: 112–117.

Wang L, Yan J, Wise MJ, et al. Distribution Patterns of Polyphosphate Metabolism Pathway and Its Relationships With Bacterial Durability and Virulence. *Front Microbiol.*, 2018;9:782.

Wang Q., Zhou L., Qiu L., Lu D., Wu Y., Zhang XB. An efficient ratiometric fluorescent probe for tracking dynamic changes in lysosomal pH. *Analyst*, 2015,140, 5563-5569.

Wat JM, Foley JH, Krisinger MJ, et al. Polyphosphate suppresses complement via the terminal pathway. *Blood*, 2014;123(5):768–776.

Watts JC, Huo H, Bai Y, et al. Interactome analyses identify ties of PrP and its mammalian paralogs to oligomannosidic N-glycans and endoplasmic reticulum-derived chaperones. *PLoS Pathog.*, 2009;5(10):e1000608.

Weitz JI., Fredenburgh JC. Platelet polyphosphate: the long and the short of it. *Blood*, 2017; 129:1574-1575.

Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 2012;482:331–338.

Wiersinga WJ., Leopold SJ., Cranendonk DR., et al. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*, 2014 Jan 1; 5(1): 36–44.

Wijeyewickrema LC, Lameignere E, Hor L, et al. Polyphosphate is a novel cofactor for regulation of complement by a serpin, C1 inhibitor. *Blood*, 2016;128(13):1766–1776.

Williams JO, Roche TE, McFadden BA. Mechanism of action of isocitrate lyase from *Pseudomonas indigofera*. *Biochemistry*, 1971;10:1384–1390.

Wirtz, S., I. Tubbe, P. R. Galle, H. J. Schild, M. Birkenbach, R. S. Blumberg, and M. F. Neurath. 2006. Protection from lethal septic peritonitis by neutralizing the biological function of interleukin 27. *J. Exp. Med.*, 203: 1875–1881.

Wittmann M., et al., IL-27 is expressed in chronic human eczematous skin lesions and stimulates human keratinocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009; 124 (1):81–89.

Wright AV, Nuñez JK, Doudna JA. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. *Cell*, 2016 Jan 14;164(1-2):29-44.

Wynick C, Petes C, Gee K. Interleukin-27 mediates inflammation during chronic disease. *J Interf Cytokine Res.*, 2014;34:741–9.

Wynn JL., Wilson CS., Hawiger J., et al.: Targeting IL-17A attenuates neonatal sepsis mortality induced by IL-18. *PNAS*, 2016; 113(19):E2627-E2635.

X

Xie L, Jakob U. Inorganic polyphosphate, a multifunctional polyanionic protein scaffold. *J Biol Chem.*m 2019;294(6):2180–2190.

Xin B, Puffenberger EG, Turben S, et al. Homozygous frameshift mutation in TMCO1 causes a syndrome with craniofacial dysmorphism, skeletal anomalies, and mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 2010;107(1):258–263.

Xue Z., Zhao H., Liu J., et al. Imaging Lysosomal pH Alteration in Stressed Cells with a Sensitive Ratiometric Fluorescence Sensor. *ACS Sens.*, 201723436-44

Y

Yang J., Chen J., Del Carmen Vitery M.: PAC, an evolutionarily conserved membrane protein, is a proton-activated chloride channel. *Science*, 2019, **364**:395–399.

Yi X, Liang Y, Huerta-Sanchez E, et al. Sequencing of 50 human exomes reveals adaptation to high altitude. *Science*, 2010;329(5987):75–78.

Z

Zaffaroni L., Peri F. Recent advances on Toll-like receptor 4 modulation: new therapeutic perspectives. *Future Med. Chem.*, 2018, 10(4), 461–476.

Zhang H, Ishige K, Kornberg A. A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2002;99(26):16678–16683.

Zhao J, Zhu D, Zhang X, et al. TMEM206 promotes the malignancy of colorectal cancer cells by interacting with AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *J Cell Physiol.*, 2019 Jul; 234(7):10888-10898.

Zhou H, Wang F, Wang Y, et al. Improved recovery and identification of membrane proteins from rat hepatic cells using a centrifugal proteomic reactor. *Mol Cell Proteomics.*, 2011;10(10):O111.008425.

Zisman D. A., Kunkel S. L., Strieter R. M., et al. MCP-1 protects mice in lethal endotoxemia. *J Clin Invest.*, 1997;99(12):2832–2836

Zou C, Wang Y, Shen Z. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J Biochem Biophys Methods.*, 2005 Sep 30;64(3):207-15.

Zuccolo J, Bau J, Childs SJ, Goss GG, Sensen CW, Deans JP. Phylogenetic analysis of the MS4A and TMEM176 gene families. *PLoS One*. 2010;5:e9369.